



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NEOPTERINA E IL-10 COMO
MARCADORES DE DEPRESSÃO E ALTERAÇÃO DE
PERSONALIDADE ASSOCIADOS AO TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO GRAVE**

Flávia Mahatma Schneider Soares

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NEOPTERINA E IL-10 COMO
MARCADORES DE DEPRESSÃO E ALTERAÇÃO DE
PERSONALIDADE ASSOCIADOS AO TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO GRAVE**

Flávia Mahatma Schneider Soares

Tese de doutorado apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-
graduação em Ciências Médicas –
PPGCM, do Centro de Ciências da
Saúde - CCS, da Universidade Federal
de Santa Catarina – UFSC.

Orientador: Prof. Dr. Roger Walz
Co-orientador: Dr. Felipe Dal Pizzol

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Soares, Flávia Mahatma Schneider
NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NEOPTERINA E IL-10 COMO
MARCADORES DE DEPRESSÃO E ALTERAÇÃO DE PERSONALIDADE
ASSOCIADOS AO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO GRAVE / Flávia
Mahatma Schneider Soares ; orientador, Prof. Dr. Roger
Walz ; coorientador, Dr. Felipe Dal Pizzol . -
Florianópolis, SC, 2015.
123 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. traumatismo cranioencefálico,
IL-10. 3. neopterina. 4. alterações de personalidade. 5.
depressão. I. , Prof. Dr. Roger Walz . II. , Dr. Felipe
Dal Pizzol . III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. IV. Título.

FLÁVIA MAHATMA SCHNEIDER SOARES

**NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NEOPTERINA E IL-10 COMO
MARCADORES DE DEPRESSÃO E ALTERAÇÃO DE
PERSONALIDADE ASSOCIADAS AO TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO GRAVE**

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção do Grau de Doutora em Ciências Médicas, apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2015.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol (Presidente)

Prof. Dr. Emílio Luiz Streck (Membro Externo)

Prof. Dra. Cristiane Ritter (Membro Externo)

Prof. Dra. Maria Marlene de Souza Pires (Membro)

Prof. Dr. João Carlos Xicota (Membro)

Prof. Dr. Jean Costa Nunes (Membro)

Flávia Mahatma Schneider Soares (Doutoranda)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Dirceu e Elisabeth pela doação plena de suas vidas no cuidado, educação, apoio e concretização dos meus sonhos.

Ao meu colega, que se tornou amigo, Dr. Marcelo Liborio Schwarzbold, pelo fundamental suporte em todas as dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Roger Walz, pela oportunidade, orientação, pelo estímulo, aprimoramento científico, apoio, confiança, compreensão, dedicação e pela indispensável contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Fundamentalmente agradeço pela honra que me concedeu ao admitir-me como sua orientanda.

Ao professor Felipe Dal Pizzol que prontamente se disponibilizou para a coorientação.

A Universidade Federal de Santa Catarina, ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas e ao Hospital Universitário, pelos ensinamentos e a possibilidade de realizar esta pesquisa.

Aos Doutores Maria Marlene de Souza Pires, João Carlos Xicota e Jean Costa Nunes, por aceitarem participar da Banca de Qualificação e pela importante contribuição para o aprimoramento científico deste estudo.

Aos pacientes vítimas de TCE e seus familiares, que consentiram as coletas de sangue, que constituíram a matéria prima do desenvolvimento desta pesquisa.

A CAPES, ao CNPQ e a FAPESC pelo auxílio financeiro.

Aos meus colegas do NUPNEC pelo aprendizado e companheirismo, especialmente ao Marcelo Liborio Schwarzbold e Alexandre Paim Diaz, colegas e amigos com quem aprendi muito; pela disposição e empenho incansáveis, além do auxílio fundamental para a realização deste estudo.

Ao meu cunhado, Jociel, sempre disposto e paciente, pelas conversas e auxílio.

A minha irmã, Carol, que, mesmo distante geograficamente, foi fonte de alento e resiliência; sempre com a palavra certa pra me encorajar nos momentos difíceis. Fonte inesgotável de amor, amizade, incentivo, carinho e compreensão.

A minha mãe, Elisabeth, que acompanhou com carinho, estímulo, amizade e muito amor, procurando amenizar a minha ansiedade a cada telefonema ou rosto desanimado, mantendo-me firme diante dos obstáculos. Muito obrigada pelos longos sorrisos, compreensão, auxílio financeiro, conselhos e pelo amor incondicional.

Ao meu amado pai, Dirceu, por ser motivo de orgulho, exemplo de vida, de comprometimento, responsabilidade com os estudos, caráter, determinação e vitória. Obrigada pela segurança, compreensão, direção, apoio, diálogos, carinho, mas fundamentalmente, pelas lições de

disciplina, seriedade, incentivo e amor incondicionais e por ser meu maior professor.

"Onde você vê um obstáculo,
alguém vê o término da viagem
e o outro vê uma chance de crescer.
Onde você vê um motivo para se irritar,
alguém vê a tragédia total
e o outro vê uma prova para sua paciência.
Onde você vê a morte, alguém vê o fim
e o outro vê o começo de uma nova etapa.
Onde você vê a fortuna, alguém vê a riqueza material
e o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor e a miséria total.
Onde você vê a teimosia, alguém vê a ignorância,
um outro compreende as limitações do companheiro,
percebendo que cada qual caminha em seu próprio passo.
E que é inútil querer apressar o passo do outro,
a não ser que ele deseje isso.
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar,
Porque eu sou do tamanho do que eu vejo
e não do tamanho da minha altura."

Fernando Pessoa

"... Seguir sempre com muita justiça a longa impávida senda da glória..."

Dirceu Soares

RESUMO

Justificativa: Traumatismo cranioencefálico é um grave problema de saúde pública, devido sua alta incidência, mortalidade e morbidade. No Brasil, cerca de 341 casos por 100.000 habitantes são registrados anualmente. Aproximadamente 50% dos sobreviventes de TCE grave apresentam sequelas de longo prazo e o aumento do risco da depressão é bem estabelecido, podendo estar relacionado com o processo inflamatório no sistema nervoso central (SNC).

Objetivos: Identificar a associação dos níveis de marcadores inflamatórios (NPT e IL-10) com a incidência de depressão e alteração de personalidade após TCE grave.

Resultados: Indivíduos do sexo masculino constituíam 78,4% da amostra e a idade média das vítimas de TCE grave foi de 31 anos. Dentre as variáveis sócio-demográficas, psiquiátricas e de hospitalização analisadas, apenas níveis séricos elevados de IL-10 ($p=0,03$) e a razão entre citocinas pró e anti-inflamatórias ($\text{TNF-}\alpha/\text{IL-10}$, $p=0,01$) estiveram independentemente associados ao aparecimento da depressão pós TCE. A incidência de alteração de personalidade foi de 24,3%. Não houve associação dos níveis séricos de neopterinina (TCE agudo) com a gravidade do TCE, tempo de coleta ou com a taxa de mortalidade ($p=0,82$).

Conclusões e implicações: Nossos resultados sugerem que o aumento sérico dos níveis de IL-10 podem ser usados como um biomarcador de mau prognóstico em pacientes vítimas de TCE grave tanto na fase aguda (mortalidade hospitalar) como na fase crônica (depressão) do TCE. Os mecanismos envolvidos nas associações observadas continuam desconhecidos e precisam ser investigados em mais estudos.

Palavras chave: traumatismo cranioencefálico, IL-10, neopterinina, alterações de personalidade, depressão.

ABSTRACT

Justification: traumatic brain injury (TBI) is a serious public health problem due to its high incidence, mortality and morbidity. In Brazil, the annual incidence of traumatic brain injury (TBI) is approximately 341 cases per 100,000 inhabitants. Approximately 50% of severe TBI survivors have long-term sequelae that impair their functionality and social reintegration. The cause of the increased risk of depression after TBI is unclear but may be inflammatory-related with increased brain sensitivity to secondary inflammatory challenges.

Objectives: Identify the association of levels of inflammatory markers (NPT and IL-10) with the incidence of depression and personality disorders after severe TBI.

Results: The sample was comprised primarily for male gender (78,4%) and the mean age of the victims was 31 years old. Among all the socio demographics, psychiatric and hospitalization variables, only the serum levels of IL-10 ($p = 0.03$) and the ratio between pro- and anti-inflammatory cytokines ($\text{TNF-}\alpha / \text{IL-10}$, $p = 0.01$) were independently associated with depression after TBI. The incidence of personality change was 24.3%. There was no association of serum neopterin (acute TBI) with the severity of TBI, time of collection of blood samples or the mortality rate ($p = 0.82$).

Conclusions: our results suggests that enhanced levels of IL-10 are a biomarker of worse prognosis of severe TBI patients evaluated in the acute (hospital mortality) and chronic (depression) phases of TBI. The mechanism involved in the observed associations remain to be investigated.

Keywords: traumatic brain injury, IL-10, neopterin, personality disorders, depression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de Lesão do TCE.	32
Figura 2. Excitotoxicidade glutamatérgica e processos intracelulares de lesão secundária.	34
Figura 3. Estrutura e função da Proteína C-reativa.	41
Figura 4. Mecanismo de Síntese da Neopterina.	42
Figura 5. Provável trajetória da barra de aço pelo cérebro de Gage.....	47
Figura 6. Curso da amostra para avaliação psiquiátrica e de qualidade de vida dos pacientes admitidos consecutivamente na UTI do HGCR devido a TCE grave (exceto por arma de fogo), 18 meses em média após o trauma.....	54
Figura 7. Níveis séricos de NPT nos pacientes vítimas de TCE.	68
Figura 8. Comparação entre os níveis séricos de NPT em pacientes vítimas de TCE.....	69
Figura 9: Achados referentes a IL-10.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Critérios de pontuação na Escala de Coma de Glasgow	28
Quadro 2. Classificação Tomográfica de Marshall	29
Quadro 3. Escala de Desfecho de Glasgow e Escala de Desfecho de Glasgow Estendida.....	29
Quadro 4. Resumo dos critérios diagnósticos para um episódio depressivo maior no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais.....	44
Quadro 5. Resumo dos critérios diagnósticos de alteração de personalidade devido a uma condição médica geral no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise univariada de dados demográficos, clínicos, radiológicos, psiquiátricos e imunológicos, de acordo com a ocorrência de depressão maior após o TCE grave	64
Tabela 2. Análise multivariada (regressão logística binária) incluindo a classificação tomográfica de Marshall da fase aguda e o uso de antidepressivos e níveis séricos de IL-10 (contínuos e categóricos) da fase crônica de TCE grave.	67

LISTA DE ABREVISTURAS E SIGLAS

AA	ÁCIDO ARACDÔNICO
AIF	FATOR DE INDUÇÃO DE APOPTOSE
AMPA	ALFA-AMINO-3-HIDROXI-METIL-5-4-ISOXAZOLPROPIÓNICO
BHE	BARREIRA HEMATO ENCEFÁLICA
Ca⁺⁺	CÁLCIO
DP	DESVIO PADRÃO
EDG	ESCALAS DE DESFECHO DE GLASGOW
EDGE	ESCALA DE DESFECHO DE GLASGOW ESTENDIDA
EROs	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
Fe₂⁺	FERRO
FIO₂	FRAÇÃO DE OXIGÊNIO INSPIRADO
GCS	ESCALA DE COMA DE GLASGOW
HGCR	HOSPITAL GOVERNADOR CELSO RAMOS
HPA	EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL
HU	HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO
IFN-γ	INTERFERON GAMA
IL	INTERLEUCINAS
IL-10	INTERLEUCINA 10
IL-10K0	ANIMAIS NOCAUTES PARA IL-10
LAD	LESÃO AXONAL DIFUSA
LS	LESÕES SECUNDÁRIAS
MHC	COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL
Na⁺/K⁺	BOMBA DE SÓDIO/POTÁSSIO
Na⁺	SÓDIO
NGF	FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL
NMDA	N-METIL-D-ASPARTATO
NO	ÓXIDO NÍTRICO
NPT	NEOPTERINA
O₂	OXIGÊNIO
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE
PEEP	PRESSÃO EXPIRATÓRIA FINAL POSITIVA
PIC	PRESSÃO INTRACRANIANA
PTA	TEMPO DE AMINÉSIA PÓS-TRAUMÁTICA
SARA	SÍNDROME DA ANGÚSTIA RESPIRATÓRIA DO ADULTO
SNC	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
TC	TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

TCE	TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO
TNF	FATOR DE NECROSE TUMORAL
TPG	TRIFOSFATO DE GUANOSINA
UFSC	UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
UTI	UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA
WT	WILD TYPE

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
1.1. DEFINIÇÃO DE TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO (TCE)	27
1.2 EPIDEMIOLOGIA	27
1.3. CLASSIFICAÇÃO DO TCE	28
1.4. FISIOPATOLOGIA DO TCE.....	31
1.4.1. Barreira Hemato Encefálica (BHE).....	32
1.4.2. Necrose e Excitotoxicidade	33
1.4.3. Estresse Oxidativo	34
1.4.4. Neuroinflamação	36
1.4.4.1. Citocinas e Marcadores inflamatórios	38
1.4.4.1.1. <i>IL-10</i>	38
1.4.4.1.2. <i>TNF-α</i>	39
1.4.4.2. PCR	40
1.4.4.3. Neopterina	41
1.5. TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS APÓS TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO.....	43
1.5.1 Depressão	43
1.5.2 Alteração de Personalidade	45
1.6. JUSTIFICATIVA.....	48
2. OBJETIVOS.....	51
2.1. OBJETIVO GERAL	51
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
3. METODOLOGIA	53
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	53
3.2 AMOSTRA	54
3.3 ASPÉCTOS ÉTICOS	54
3.4 MEDIDAS.....	55
3.4.1 Gravidade do Trauma	55
3.4.2 Avaliação de Fase Aguda	55

3.4.2.1 Coleta das Variáveis.....	55
3.4.2.2 Análise dos Marcadores Inflamatórios.....	56
<i>Determinação das Citocinas.....</i>	<i>56</i>
<i>Determinação de Neopterina.....</i>	<i>57</i>
<i>Determinação da PCR.....</i>	<i>57</i>
3.4.3 Avaliação de Fase Crônica	58
3.4.3.1. Avaliação Psiquiátrica e Qualidade de Vida	58
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4. RESULTADOS	63
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES.....	79
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8 APÊNDICES	97
8.1. LETTER SUBMETIDA	97
8.2. LETTER SUBMETIDA	105
8.3. ARTIGO PUBLICADO.....	111
9. ANEXOS.....	121
ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM SERES HUMANOS	122
ANEXO B - PUBLICAÇÕES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO	123

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. DEFINIÇÃO DE TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO (TCE)

Trauma cranioencefálico (TCE) corresponde a qualquer agressão que acarrete lesão anatômica ou comprometimento funcional do encéfalo. O TCE pode ser definido como lesão do tecido encefálico causado por forças mecânicas externas (penetrantes ou não), evidenciado por: alteração da função cerebral, alteração da consciência, convulsão, déficit neurológico sensitivo ou motor, fratura de crânio e lesões intracranianas diagnosticadas, coma ou morte (MAAS et al., 2008). Além disso, podemos notar a ocorrência de TCE sem que tenha havido impacto direto na cabeça, através da exposição a forças inerciais (comuns nos acidentes automobilísticos) (ROSENFELD et al. 2013).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Os TCEs são frequentes e constituem um problema de saúde pública que, de acordo com a organização mundial de saúde (OMS), são a principal causa de morbidade, mortalidade e incapacidade neurológica em pessoas com menos de 40 anos (ROOZENBEEK et al. 2013). Quanto ao gênero, a maior incidência de TCE é observada em homens, principalmente em adolescentes e adultos jovens (BRUNS/HAUSER, 2003). O TCE grave está associado a uma taxa de mortalidade ao redor de 30%, e a recuperação dos sobreviventes é marcada por seqüelas neurológicas graves e por uma qualidade de vida muito prejudicada (ROOZENBEEK, B. et al. 2013).

Nos Estados Unidos, cerca de 1,4 milhões de pessoas procuram cuidados médicos por algum tipo de TCE todos os anos. Dessas, cerca de 235.000 são hospitalizadas e 50.000 vão a óbito, enquanto os sobreviventes frequentemente têm sequelas físicas, cognitivas, psiquiátricas e psicológicas (CORONADO et al. 2011). No Brasil, a incidência anual de TCE é de aproximadamente 341 casos por 100.000 habitantes (MASINI 1994). Dados do SINETRAN/DETRAN de Santa Catarina, em 2003, mostraram 1.679 mortes por acidentes de trânsito. A maior parte dos óbitos (80%) ocorreu em pacientes com idade entre 10 e 50 anos (DETRAN/SC, 2004). 75% dos casos de TCE grave que ocorrem na Grande Florianópolis estão relacionados a acidentes de trânsito (MARTINS et al. 2009).

Dentre as principais sequelas, os transtornos psiquiátricos figuram como um dos mais prevalentes e associados negativamente à reabilitação social dos pacientes (SCHWARZBOLD et al. 2008, BENEDICTUS et al. 2010, DIAZ et al. 2011).

1.3. CLASSIFICAÇÃO DO TCE

Costumamos classificar o TCE de acordo com sua gravidade, quanto a dimensão do dano estrutural, quanto ao desfecho e ainda quanto ao prognóstico. Além destas classificações, o TCE é categorizado em fechado ou penetrante, de acordo com o mecanismo que o originou, e ainda quanto a sua morfologia, podendo ser lesão focal ou difusa (SAATMAN et al. 2008).

Podemos definir a gravidade do TCE pelo nível de consciência do paciente e pela duração da amnésia pós-traumática (PTA). Esta avaliação é realizada por meio da Escala de Coma de Glasgow (GCS), que examina as respostas verbal, motora e ocular a um estímulo e o escore na GCS é a soma da pontuação destes parâmetros (quadro 1). A pior nota nesta escala é 3 e a melhor 15, sendo que os pacientes são estratificados quanto à gravidade: 3-8 grave, 9-13 moderado e 14-15 leve (JENNETT, 1976).

Quadro 1. Critérios de pontuação na Escala de Coma de Glasgow

Melhor Resposta Ocular	Melhor Resposta Verbal	Melhor Resposta Motora
4 - Espontânea	5- Orientado	6- Obedece a Comandos
3 - Por comando verbal	4- Desorientado, apropriado	5- Localiza Dor
2 - Por estímulo doloroso	3- Palavras Inapropriadas	4- Retirada Inespecífica
1- Ausente	2- Fala Incompreensível	3- Flexão Anormal
	1- Ausente	2- Extensão Anormal
		1- Ausente

Fonte: JENNETT et al., 1976.

Outra maneira de classificarmos o TCE é por meio da dimensão do dano estrutural, que é estimada pela Escala de Marshall, como descrito no Quadro 2. Esta determinação é baseada em imagens de tomografia computadorizada (TC) e descreve a ausência ou presença de uma lesão de massa (MARSHALL; MARSHALL; KLAUBER, 1991). Como lesão de massa, caracterizamos o aumento de volume do conteúdo intracraniano (que pode ser ocasionada por contusões, edemas ou outros). Esta escala diferencia lesões difusas, porém falha em prever o prognóstico.

Quadro 2. Classificação Tomográfica de Marshall

Tipo de Lesão	Principais Achados
Lesão Difusa I	Nenhuma lesão visível
Lesão Difusa II	Cisternas presentes, desvio de linha média de 0-5mm, e/ou lesão densa presente, sem lesão de massa maior que 25 mL de volume, pode incluir fragmentos ósseos ou corpos estranhos
Lesão Difusa III (edema)	Cisternas comprimidas ou ausentes, desvio de linha média de 0-5 mm, nenhuma lesão de alta densidade maior que 25 mL em volume
Lesão Difusa IV (desvio)	Desvio de linha média maior que 5 mm, sem lesão de massa maior que 25 mL de volume
Lesão de massa operável	Toda lesão que pode ser evacuada cirurgicamente
Lesão de massa não operável	Lesão de alta densidade maior que 25 mL em volume, não passível de intervenção cirúrgica

Fonte: MARSHALL; MARSHALL; KLAUBER, 1991.

Determinamos as vítimas de TCE, quanto ao desfecho, utilizando as escalas de desfecho de Glasgow (EDG) e escala de desfecho de Glasgow estendida (EDGE). Tais escalas tentam medir e transformar em um valor tangível o grau de disfunção neurológica que segue ao TCE, como apresentado no Quadro 3 (WILSON; PETTIGREW; TEASDALE, 1998).

Quadro 3. Escala de Desfecho de Glasgow e Escala de Desfecho de Glasgow Estendida.

Escala de desfecho de Glasgow	Escore	Escala de desfecho de Glasgow estendida	Escore
Morte	1	Morte	1
Vegetativo	2	Vegetativo	2
Comprometimento severo (consciente, mas dependente)	3	Comprometimento grave de membros inferiores	3
Comprometimento moderado (independente mas incapaz)	4	Comprometimento grave de membros superiores	4
Boa recuperação (pode realizar atividades normais)	5	Comprometimento moderado de membros inferiores	5
		Comprometimento moderado de membros superiores	6
		Boa recuperação de membros inferiores	7
		Boa recuperação de membros superiores	8

Fonte: WILSON; PETTIGREW; TEASDALE, 1998.

Outra forma de classificarmos o TCE é quanto ao seu prognóstico. Apesar de a GCS ser bastante eficiente no manejo clínico de fase aguda, ela não nos fornece dados de longo prazo pós TCE (fase crônica). Sendo assim, a avaliação do tempo de duração da PTA é mais acurada para o prognóstico funcional (NAKASERICHARDSON et al. 2011). Em condições ideais, a duração da PTA deve ser determinada de forma prospectiva, durante a fase aguda, por meio de questionários que abordam a recordação de fatos além de avaliar as condições de orientação do paciente (FURBRINGER E SILVA e DE SOUSA, 2007). No entanto, na maior parte das vezes, realizamos a avaliação retrospectiva: perguntamos aos pacientes, já na fase crônica, quais suas primeiras lembranças após o TCE. Nakase-Richarddson e colaboradores evidenciaram que o prognósticos funcional é ruim quando a duração da PTA é superior a 8 semanas (NAKASE-RICHARDSON et al., 2011).

Também podemos avaliar o prognóstico utilizando o instrumento fornecido pelo estudo "International Mission for Prognosis and Analysis of Clinical Trials in Traumatic Brain Injury" (IMPACT). Tal trabalho desenvolveu uma calculadora prognóstica baseada nos dados de admissão de mais de 8500 pacientes (STEYERBERG et al. 2008). Ao acessarmos o endereço "www.tbi-impact.org" podemos utilizar esta ferramenta e realizar as avaliações dos nossos pacientes a partir do fornecimento de características clínicas (como reposta motora, idade, pupilas, etc). Dessa maneira, a calculadora nos possibilita estabelecer uma escala prognóstica que pode ser utilizada na clínica para a predição do desfecho. Existe um estudo afirmando que o poder preditivo desta calculadora pode ser ampliado com o uso de biomarcadores de TCE (CZEITER et al. 2012). Para determinarmos um bom biomarcador, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na fase inicial do TCE devem ser minuciosamente estudados. Além destes aspectos, o entendimento mais detalhado dos mecanismos de regulação nos permitirá estudar a ativação de mecanismos de neuroproteção endógenos.

O TCE ainda pode ser definido como penetrante ou fechado. O TCE penetrante, ocorre quando há perfuração do parênquima encefálico (esmagamento, projétil de arma de fogo ou arma branca) que gera lesões focais e abertas. Em geral, é mais grave, associado a maiores complicações, exige tratamento cirúrgico agudo e tem menor incidência (PEEK-ASA, MCARTHUR et al. 2001) As lesões focais são compostas por hematomas - intra ou extracerebrais - ou áreas isquêmicas delimitadas que acometem apenas uma região do cérebro. Nas lesões puramente focais, presume-se que o restante do encéfalo mantenha suas propriedades de complacência tecidual e vascular preservadas

(MASTERS, MCCLEAN, ARCARESE. 1987). Já no TCE fechado, não ocorre contato com o conteúdo intracraniano; as lesões primárias podem resultar da movimentação cerebral associada à energia cinética do acidente. O cérebro é sujeito a forças mecânicas que o empurram contra os ossos do crânio (mecanismo de golpe e contragolpe), ocorrendo assim o processo de estiramento dos neurônios e de vasos sanguíneos cerebrais, decorrente do movimento do cérebro (lesão axonal difusa), podendo causar prejuízo na funcionalidade neuronal (MENDELOW et al 1983; TEASDALE, MATHEW 1996).

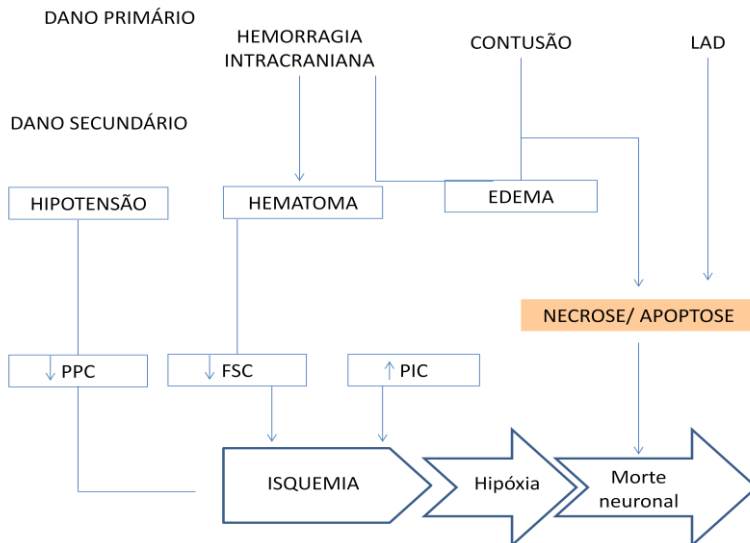
1.4. FISIOPATOLOGIA DO TCE

Os principais fatores das lesões causadas no TCE são determinados pelas forças biomecânicas que ocorrem no momento do impacto, bem como pelos fatores decorrentes das lesões sistêmicas, ocasionando agravamento das lesões neuronais. Nas últimas décadas tornou-se claro que grande parte da lesão neuronal após TCE grave não ocorre instantaneamente, mas evolui por vários dias (e até anos) após o impacto (NOLAN 2005, TEASDALE, MATHEW 1996).

As lesões que ocorrem como resultado imediato e direto do trauma são chamadas Lesões Primárias. Em geral, correspondem principalmente a fratura de crânio, contusões, lacerações da substância cinzenta e lesão axonal difusa (LAD) (substância branca) (SAHUQUILLO et al. 2001) (Figura1).

As Lesões Secundárias (LS) referem-se as respostas fisiopatológicas deflagradas pelo dano inicial, desenvolvendo-se por horas, até meses ou anos, após o trauma (NOLAN 2005). Esse tipo de lesão é resultante da interação de fatores intra e extracerebrais, que se somam para inviabilizar a sobrevivência de células encefálicas, poupadas pelo trauma inicialmente, mas que são atingidas após o processo de quebra da barreira hemato encefálica (BHE) (LA PLACA et al. 2007). Os mecanismos mais estudados na LS são a disfunção do fluxo sanguíneo e isquemia cerebral, excitotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação causados por distúrbios iônicos e bioquímicos que estão relacionados tanto à lesão primária como à secundária.

Figura 1. Mecanismos de Lesão do TCE.



A lesão primária pode levar diretamente a morte celular. Após a lesão inicial, lesões secundárias se instalam causando desequilíbrio entre PPC (pressão de perfusão cerebral) e PIC (pressão intracraniana) o que leva a alterações no fluxo sanguíneo do cérebro (FSC), gerando isquemia, hipóxia e morte celular.

Fonte: Figura adaptada de NORTH et al.

Para entendermos o processo de formação de LS é essencial conhecer alguns conceitos relacionados à BHE.

1.4.1. Barreira Hemato Encefálica (BHE)

A BHE é constituída de uma camada de células endoteliais justapostas e unidas pelas junções ocludentes. Ela está envolta pela micróglia, astrócitos, células mesenquimais de sustentação do capilar, neurônios, e matriz extracelular, que desempenham um papel importante na manutenção da sua integridade. Em situações normais, esta barreira, que permeia o sistema nervoso central (SNC), não possui aberturas e impede o transporte de compostos hidrofílicos através das junções ocludentes, reações enzimáticas e sinalização de neurotransmissores (PARDRIDGE, 2005). No endotélio cerebral, que compõe a BHE, as mitocôndrias estão presentes em maior número, quando comparado com células endoteliais periféricas. Este elevado número de mitocôndrias possibilita o fornecimento de energia adequado para o transporte ativo

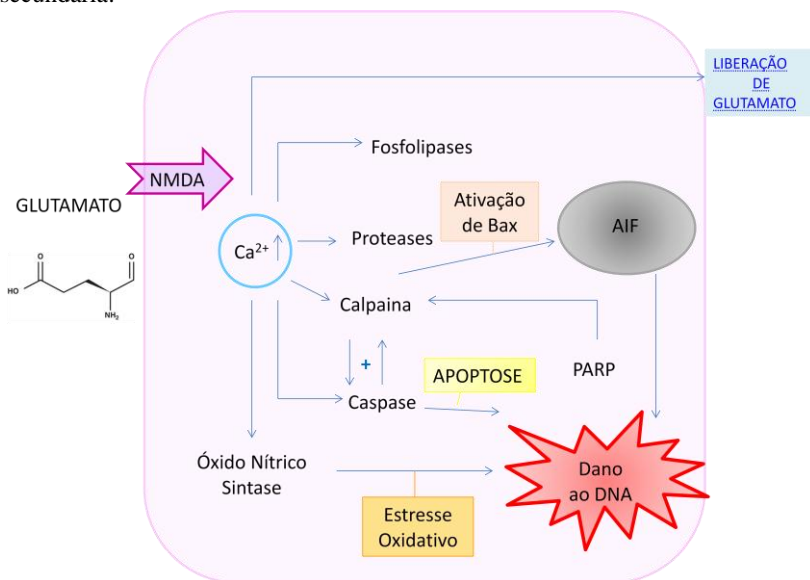
de várias proteínas e fatores exigidos pelo SNC (NIMJEE et al., 2011). Além disto, a BHE transporta seletivamente moléculas por difusão facilitada e transporte ativo. O comprometimento da integridade da BHE é, na verdade, o catalisador para inúmeros eventos bioquímicos e imunológicos dentro do cérebro, após o TCE (LA PLACA et al. 2007). A partir do momento em que a BHE se torna permeável, iniciam os processo de morte celular (necrose) e excitotoxicidade.

1.4.2. Necrose e Excitotoxicidade

A necrose é o principal mecanismo de morte celular no TCE e é responsável pela falência energética das células que se tornam incapazes de manter sua homeostase. Dessa maneira, é um processo que envolve uma resposta inflamatória de maior intensidade ao seu redor. Os mais conhecidos estímulos que levam a necrose são a excitotoxicidade e o estresse oxidativo.

A excitotoxicidade é o mecanismo pelo qual o glutamato (neurotransmissor mais abundante no cérebro de mamíferos) e outros neurotransmissores excitatórios causam lesão celular (LIPTON, ROSENBERG 1994). Primeiramente, a energia cinética do TCE causa deformação dos axônios, que leva à despolarização das membranas celulares e liberação glutamato na fenda sináptica. Em seguida, podemos observar que fatores como a hipóxia e estresse oxidativo comprometem o controle da permeabilidade da membrana e aumentam ainda mais a presença do glutamato extracelular. O glutamato liga-se tanto a receptores ionotrópicos pós-sinápticos, N-metil-d-aspartato (NMDA) e alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), como aos metabotrópicos (BRUNO 2001). Após um período variável de exposição ao glutamato, a homeostase do cálcio citoplasmático falha e os neurônios sofrem necrose. Dessa forma, a lesão celular na excitotoxicidade ocorre em dois estágios. Inicialmente, há um aumento no influxo de Na^+ com consequente edema celular. Na sequência, ocorre a abertura de canais de Ca^{++} que leva ao acúmulo excessivo de cálcio intracelular. Este acúmulo de cálcio é capaz de promover a ativação de fosfolipases, proteases e óxido nítrico, que desencadeiam uma série de eventos que culminam com a morte celular (NATHOO 2003). A ativação da fosfolipase A aumenta a permeabilidade da membrana, gera a formação de ácido aracdônico (AA) e radicais livres.

Figura 2. Excitotoxicidade glutamatérgica e processos intracelulares de lesão secundária.



A excitotoxicidade glutamatérgica dispara diversos processos de lesão intracelular que iniciam quando o glutamato se liga a um receptor pós-sináptico NMDA, aumentando os níveis de cálcio intracelular. Isto leva à ativação de enzimas, tais como fosfolipases, proteases (e.g. calpaínas, caspases) e da enzima óxido nítrico sintetase. A protease calpaína degrada o citoesqueleto e ativa outras proteases, como as caspases, iniciando o processo de apoptose. Caspases podem, por sua vez, ativar a calpaína em uma alça de retroalimentação positiva. Em paralelo, uma via apoptótica independente de caspase é também ativada onde o fator de indução de apoptose (AIF), o qual é liberado do espaço intermembrana da mitocôndria. O AIF migra, então, para o núcleo, onde inicia processos que levam a condensação da cromatina e fragmentação de DNA. O óxido nítrico, produzido pela enzima óxido nítrico sintetase também pode danificar o DNA. A ativação da poli-ADP-ribose polimerase (PARP) também pode provocar danos ao DNA. O aumento do cálcio intracelular também provoca a liberação de glutamato, contido nas vesículas, assim, perpetuando e espalhando este processo.

Fonte: adaptada de GENNARELLI TA, 1993.

1.4.3. Estresse Oxidativo

A ação dos radicais livres formados é o processo que denominamos estresse oxidativo. No TCE, a hipóxia e o glutamato (pela

ativação da fosfolipase A) são os principais fatores para o acúmulo de radicais livres. Além disso, em condições fisiológicas, o cérebro consome cerca de 20% do O_2 utilizado pelo organismo, produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO) como consequência do metabolismo aeróbio. O SNC ainda possui grande quantidade de ferro circulante, para a produção de neurotransmissores e mielina. Com um aumento da oxidação, ocorre liberação Fe_{2+} . O ferro livre contribui para a geração do radical $\bullet OH$ através da reação de Fenton ou de Harber Weiss (VALKO et al., 2007). O SNC também apresenta uma baixa concentração de enzimas antioxidantes, quando comparado com outros órgãos (ex. musculatura estriada esquelética) e isso combinado com seu grande consumo de O_2 , o torna vulnerável a EROs (DRINGEN, GUTTERER, HIRRLINGER 2000).

As EROs são metabólitos reativos formados a partir da redução parcial do oxigênio. O metabolismo energético celular necessita da presença de O_2 como aceptor final de elétrons durante o processo de respiração celular (fosforilação oxidativa). Apesar do O_2 ser fundamental para a eficiência do metabolismo energético, ele também pode ser tóxico para as células. Além das EROs, as espécies reativas de nitrogênio também possuem uma grande importância biológica. Em especial, o óxido nítrico (NO), que está envolvido em processos fisiológicos como regulação do sistema imune, regulação da pressão arterial e neurotransmissão (BERGENDI et al. 1999). Apesar de necessárias para o funcionamento normal da célula, as EROs e NO podem promover danos celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os radicais livres lesam a célula por diferentes mecanismos. Na membrana, eles são responsáveis pela inibição da bomba de Na^+/K^+ , oxidam a dupla camada de lipídeos e hidrolisam fosfolípidios, que resulta num aumento da permeabilidade, no acúmulo de cálcio intracelular e na liberação do glutamato. Ao hidrolisar fosfolípidios levam também a formação de AA, cujas consequências foram descritas acima (WILSON, GELB 2002). No TCE, observamos a ação do NO (produzido pelo aumento do Cálcio intracelular associados ao mecanismo de agressão celular) no aumento do fluxo sanguíneo, aumento da PIC e na formação de edema cerebral. O estresse oxidativo também causa dano aos ácidos nucleicos, incluindo a fragmentação do DNA, que consiste em quebras nas fitas simples e duplas do DNA (CHEN et al. 1997).

1.4.4. Neuroinflamação

Durante a fase aguda do trauma, um grande número de monócitos e neutrófilos deixa a corrente sanguínea e migra em direção aos locais onde há lesão tecidual. Neste contexto, sobressaem-se as interleucinas (IL) produzidas pelos macrófagos, linfócitos e leucócitos aderidos ao endotélio, e o fator de necrose tumoral (TNF), sintetizado preferencialmente por macrófagos ativados. Citocinas são substâncias vasoativas responsáveis por aumentar a permeabilidade vascular e induzir a formação de edema (KIM et al., 1992) exercendo efeitos citotóxicos diretos nas células neuronais e gliais (TALLEY et al., 1995). Por outro lado, citocinas inflamatórias também iniciam processos de cicatrização de feridas como fibrose e neovascularização (GIULIAN et al., 1989).

Podemos afirmar também que a neuroinflamação após o TCE é apoiada pelos componentes internos do tecido cerebral. No entanto, os astrócitos e microglia, células residentes no SNC, expressam baixos níveis das classes I e II do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC), mas são capazes de sintetizar citocinas, quimiocinas e seus receptores. A capacidade imunológica da glia já foi implicada em uma variedade de patologias do SNC, e seu papel, em qualquer situação, foi mostrado variando de apoptose simples à apresentação de antígenos, resolução de excitotoxicidade à liberação de moléculas neurotóxicas e fatores neurotróficos. Sendo assim, a neuroinflamação desempenha duas funções importantes e opostas: o dano cerebral mediado pela inflamação libera substâncias neurotóxicas, mas, por outro lado, este processo inflamatório está envolvido no reparo do tecido lesionado (SOARES et al. 2012, MORGANTIKOSSMANN et al. 1992).

Podemos considerar o TCE uma condição neuro inflamatória do SNC, sendo que a ruptura da BHE leva ao acúmulo de leucócitos da circulação sistêmica, que iniciam liberação de citocinas pró-inflamatórias, proteases citotóxicas e espécies reativas de oxigênio, por sua vez, iniciam as funções imunológicas da glia (STAHEL et al. 2000). Após o TCE, a microglia torna-se morfológica e imunologicamente indistinguível dos macrófagos infiltrantes da periferia; ambos compartilham da mesma linhagem de monócitos e possuem um papel primordial de defesa através de fagocitose (GEHRMANN et al. 1995, RAIVICH et al. 1999). Em modelos comumente usados de neuroinflamação, a microglia têm sido caracterizada como sendo a fonte predominante de moléculas pro-inflamatórias, tais como as interleucinas e as EROs (NAKAJIMA/KOHSAKA 2004).

Em contraste, os astrócitos assumem um papel muito mais favorável, secretando fatores de crescimento, favorecendo a angiogênese, proporcionando fontes alternativas de energia (na forma de glutamina e de lactato) para o recurso empobrecido do neurônio e incentivando a diferenciação dos neurônios recém-formados (LIBERTO et al. 2004, MARION,1999). No entanto, nenhum tipo de célula é completamente neurotrófica ou neurotóxica: a microglia têm demonstrado ser fonte de neurotrofinas da família do fator de crescimento neural (NGF) (ELKABES et al. 1996), ao passo que os astrócitos são bem conhecidos por desempenharem um papel na formação da cicatriz glial, um fator de controvérsia na viabilidade dos neurônios sobreviventes e regeneração axonal (ROSTWOROWSKI 1997). Essa dualidade é a marca da neuroinflamação no TCE: nenhum fator, molécula ou célula podem ser vistos como puramente negativos ou benéficos na sequência de traumatismo cerebral.

A ativação e proliferação dos astrócitos residentes são típicas de eventos inflamatórios no TCE (MORGANTI-KOSSMANN et al. 2002). No entanto, a influência do sistema imune sobre a resposta cerebral tem sido essencialmente caracterizada por experiências em lesões focais. A sequência inflamatória de infiltrado neutrofílico inicia no prazo de 24 h do trauma, com atraso de recrutamento de macrófagos em 3-5 dias pós TCE, essencialmente, aplica-se a contusão no cérebro (CLARK et al. 1994, HOLMIN et al. 1998). Em contraste, a lesão axonal difusa experimental mostra imuno ativação de astrócitos e microglia e infiltração de macrófagos periféricos, com uma resposta aguda de neutrófilos ausente na circulação sistêmica (CSUKA et al. 2000). Essa reação imunológica central diferente pode resultar de vários graus de perturbação da BHE (BARZO et al. 1996) e, além disso, têm uma influência sobre a resposta imune global "montada" pelo paciente. Citocinas, produzidas sistemicamente e por via intratecal, uma variedade de moléculas não-imunes e células do sistema imunológico, o recrutamento de células hematológicas da periferia, o aumento da permeabilidade vascular cerebral, bem como a ativação continuada de células residentes do SNC estão diretamente envolvidas no processo de inflamação pós TCE (LUCAS et al. 2006). Esses mediadores desempenham um papel vital não apenas na resposta de propagação neuroinflamatória, mas também são indicadores úteis de sua presença. Entretanto, as citocinas não são sinônimo de danos: suas funções neuroprotetoras e neurotróficas também são bem caracterizadas e são conhecidas por serem necessárias para o neurodesenvolvimento e a manutenção da função normal do SNC (MAIER et al. 2005,

BENVENISTE 1998). Assim, as citocinas têm sido os principais exemplos da dicotomia da resposta imune, com a sua detecção formando a base da investigação neuroinflamatória no TCE. Entendermos esses mecanismos é essencial para o progresso no estudo das abordagens clínicas e farmacológicas utilizadas nos últimos anos (NAGAMOTO-COMBS et al. 2007). O papel dos mediadores inflamatórios no desenvolvimento da lesão secundária tem sido investigado. Uma variedade de mediadores está implicada, incluindo citocinas.

1.4.4.1. Citocinas e Marcadores inflamatórios

Um processo caracterizado por resposta inflamatória sistêmica intensa, que acomete tanto tecido cerebral traumatizado quanto sadio, é freqüente em pacientes vítimas de TCE. O processo inflamatório que ocorre após o TCE inclui supra-regulação de moléculas de adesão no endotélio de vasos cerebrais associada ao acúmulo de neutrófilos e produção de citocinas, além de ativação do sistema complemento (GOPCEVIC et al. 2007). Citocinas são proteínas de baixo peso molecular, envolvidas na iniciação de estágios efetores da imunidade e inflamação, que regulam a duração e amplitude da resposta. Geralmente, são produzidas transitoriamente, agem em concentração picomolar e interagem com receptores específicos da superfície celular. Muitas citocinas são pleiotrópicas, mas a resposta de uma célula a determinada citocina depende da concentração no local, do tipo de célula e dos outros reguladores celulares que estão continuamente expostos. As citocinas interagem em rede: primeiro pela indução mútua, seguida pela transmodulação em receptores de superfície celular e depois através da interação sinérgica, aditiva ou antagônica na função celular (JENNA M et al. 2010).

Entre as citocinas, o interesse está particularmente focado na interleucina 10 (IL-10) e no fator de necrose tumoral α (TNF- α), mas alguns estudos avaliam a interleucina 6 (IL-6) (FINFER/COHEN 2001, MUSSACK et al 2002, GOPCEVIC et al. 2007).

1.4.4.1.1. IL-10

A interleucina-10 (IL-10) é considerada uma das principais citocinas envolvidas na patofisiologia do TCE. Sua principal função é atuar na supressão da resposta imune e inflamatória (SOARES et al. 2012). É produzida por células Th0, Th1, Th2, células B, monócitos e

macrófagos ativados. A IL-10 suprime respostas de célula T a antígeno-específico através da inibição da capacidade de apresentação de antígeno aos macrófagos, que ocorre pela regulação negativa do MHC classe II e media ativação glial. A IL-10 também inibe a produção de IFN- γ , age como fator quimiotático específico para células TCD8 e suprime a capacidade de células TCD4 migrar em resposta a IL-8. Ela ainda atua como um potente fator de crescimento e de diferenciação para células B ativadas e pode ter papel importante na amplificação da resposta imune humoral. Em geral, a IL-10 promove resposta Th2 enquanto suprime reação de hipersensibilidade tardia e outras reações mediadas por células Th1. Por ser um anti-inflamatório extremamente potente, a IL-10 age diminuindo a patologia associada a muitas doenças. Estudos experimentais em IL-10 têm demonstrado seus efeitos benéficos, com a administração exógena da citocina auxiliando a recuperação neurológica e redução de citocinas pro- inflamatórias (KNOBLACH/FADEN 1998). Os níveis de IL-10 no líquido mostram aumento agudo nas primeiras 24 h após TCE, correlacionando com a diminuição da TNF(CSUKA et al. 1999, MORGANTI-KOSSMANN et al. 1999). Curiosamente, os níveis séricos de IL-10 são elevados tanto em pacientes que sofreram TCE grave, bem como os politraumatizados, tornando-a um marcador não-específico do TCE (SHIMONKEVITZ et al. 1999, SHIOZAKI et al. 2005). Além disto, a IL-10 tem mostrado correlação com um aumento da mortalidade em pacientes pediátricos, bem como eventos séptico em paciente politraumatizado (BELL et al. 1997).

1.4.4.1.2. TNF- α

Os astrócitos e a micróglia, logo após o trauma, liberam IL-1 β e TNF- α , levando ao hipertrofia das células do SNC nativas que, por sua vez, causam a liberação parácrina de TNF a partir dessa fonte celular (KITA et al 1997, SHOHAMI et al. 1999). Ao fazê-lo, TNF incentiva o recrutamento de leucócitos da circulação periférica, a liberação de enzimas proteolíticas que levam à degradação da BHE, e inibição de repovoamento astrocitário e regeneração neuronal, especialmente importante na lesão difusa (FABER-ELMAN et al. 1995, POBER/COTRAN 1990, ROSENBERG et al. 1995, TCHELINGERIAN et al. 1995). O TNF- α participa de muitas atividades biológicas com a IL-1 β , como estimulação da metaloproteinase, produção de prostaglandinas e propriedades pró inflamatórias e está intimamente relacionado com a formação de edema

cerebral (FAN et al. 1996, TAUPIN et al. 1993, MAIER et al. 2005). Estudos clínicos têm demonstrado níveis elevados de TNF α em pacientes com TCE.(FINFER/COHEN 2001, CRESPO et al. 2007).

Descobertas feitas em animais nocautes para TNF- α instituíram o conceito de dualidade do funcionamento da resposta neuroinflamatória no TCE: o TNF- α , uma citocina associada a danos agudos no SNC, também foi relacionada com redução do dano neuronal e menor comprometimento motor no longo prazo (STAHEL et al. 2000). As propriedades neuroprotetoras do TNF, além de seus efeitos neurotóxicos, têm sido ultimamente reconhecidas no TCE humano, em uma relação inversa com as citocinas IL-18 (pró-inflamatória) e IL-10 (anti-inflamatória) (CSUKA et al. 1999, SOARES, et al. 2012). Um estudo de 28 pacientes com TCE, durante um período de 3 semanas, apresentou média de níveis líquóricos de TNF mais elevados que os níveis séricos médios, corroborando com os achados de que há produção endógena de TNF dentro do SNC (CSUKA et al. 1999). Um estudo recente, baseado na medição do receptor solúvel de TNF (que têm propriedades anti-inflamatórias, devido à sua capacidade de vincular circulantes de TNF) em 29 pacientes com TCE produziu o resultado oposto, onde os níveis plasmáticos superaram os do líquido. Isso reforça que, agudamente, fatores pró-inflamatórios prevalecem dentro do SNC quando há rompimento da BHE, apesar das atividades de mediadores anti-inflamatórios.

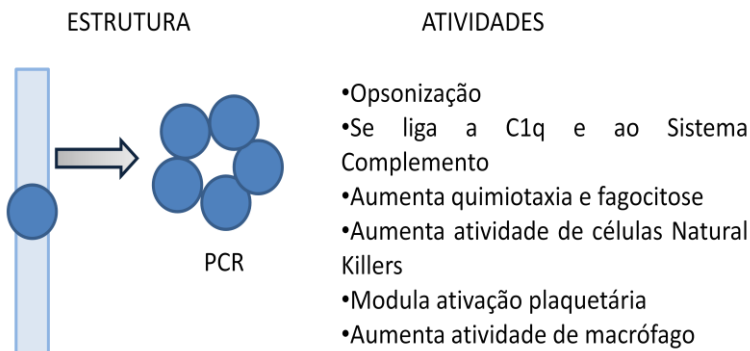
1.4.4.2. PCR

Proteína C-reativa (PCR) é uma proteína humana pentamérica, composta por cinco subunidades idênticas, dispostas em simetria cíclica num único plano, ligadas de forma não covalente (Figura 3) (PANICHI et al. 2000). A PCR é sintetizada pelo fígado, em resposta a fatores libertados por macrófagos e adipócitos. A função precisa da PCR in vivo ainda é incerta; no entanto, vários tipos importantes de atividades biológicas podem ser moduladas pela PCR (PANICHI et al. 2000).

A proteína C reativa foi descoberta na década de 1930, através de análises de pacientes com pneumonia. Os pesquisadores notaram que a PCR encontrava-se muito elevada durante a fase ativa da pneumonia, mas desaparecia do sangue quando o paciente ficava curado. Mais investigações demonstraram que esse fenômeno não ocorria somente na pneumonia, mas sim em qualquer infecção relevante no organismo, principalmente aquelas de origem bacteriana. No entanto, a PCR não se

limita a detectar infecções (TILLET/FRANCIS 1930; PEPYS/HIRSCHFIELD 2003). Qualquer doença que provoque uma reação inflamatória por parte do organismo pode cursar com níveis elevados de proteína C reativa. Entre as condições não infecciosas que podem provocar elevação da PCR, podemos relacionar o TCE.

Figura 3. Estrutura e função da Proteína C-reativa.



Cromossomo 1

PCR humana é uma pentraxina de cadeia curta. O gene de PCR está localizado no primeiro cromossomo (1q21-q23). É um indicador extremamente sensível de inflamação. Suas principais funções encontram-se listadas

Fonte: Figura adaptada de PANICHI et al. 2000.

A utilização da PCR como marcador da inflamação é usual e bastante difundida no meio clínico. Seus níveis plasmáticos são detectáveis nas primeiras horas de dano tecidual e se mantém estáveis até 72 horas após a lesão (KUSHNER et al. 1978).

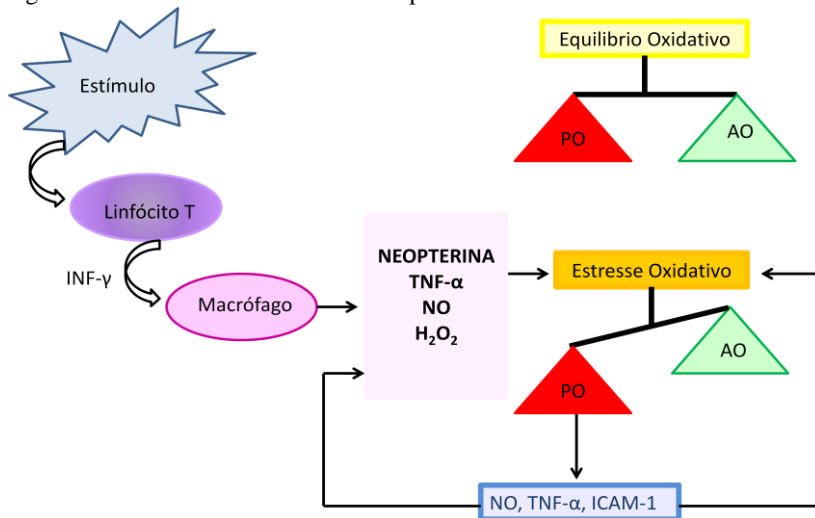
1.4.4.3. Neopterina

A neopterina (NPT) integra o grupo das pteridinas (juntamente com o folato) e é um derivado do Trifosfato de Guanosina (TPG) (FUCHS et al. 1988). O TPG dá origem ao D7-8 Trifosfato de Dihidroneopterina (NH_2P_3) que é precursor da NPT. A NPT é cofator natural da hidroxilação da tirosina, triptofano e fenilalanina e conduz a produção de neurotransmissores como a dopamina e serotonina (EDITORIAL LANCET, 1988). É produzida por monócitos/macrófagos durante a resposta Th1 após estimulação pelo $\text{IFN-}\gamma$ (Figura 4) (HUBER et al. 1984). Sua produção por macrófagos está intimamente

ligada a produção de EROs por estas células e a determinação de NPT pode verificar a extensão da ativação imunológica (HOFFMAN et al. 2003). Níveis aumentados de NPT se relacionam com alterações imunológicas associadas ao processo de estresse oxidativo, incluindo ativação, desregulação e disfunção celular (LEDOCHOWSKI et al. 2001, BAIER-BITTERLICH et al. 1996).

Numerosos estudos têm sido realizados para caracterizar a NPT como um indicador para o início, a progressão e prognóstico de doenças. Altas concentrações de NPT no soro foram mostradas como indicador confiável para a gravidade das infecções virais, bacterianas, parasitárias ou induzidas por fungos, além de dos processos de rejeição de enxerto (transplantes) e processos de resposta inflamatória sistêmica (DAITO et al. 1994, FUCHS et al. 1984, STROHMAIER et al. 1987).

Figura 4. Mecanismo de Síntese da Neopterina.



Após a ativação, os linfócitos Th1 secretam IFN- γ que estimula monócitos/macrófagos para produzir e libertar mediadores como a neopterina, óxido nítrico (NO), o peróxido de hidrogénio (H₂O₂). A produção excessiva destes agonistas vai perturbar o equilíbrio oxidativo (pró/anti-oxidante = PO/AO). Interações de Neopterina com vários sistemas redox celular leva a uma formação permanente dos agonistas inflamatórias (por exemplo fator de necrose tumoral (TNF), molécula-1 de adesão intercelular (ICAM1).

Fonte: HOFFMAN G et al 2003.

1.5. TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS APÓS TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO

1.5.1 Depressão

A maioria das doenças psiquiátricas não pode ser confirmada por exames laboratoriais ou anatomo-patológicos. Dentre elas, a depressão caracteriza-se como uma síndrome psiquiátrica que apresenta, como principais sintomas, redução de humor e perda geral de prazer ou interesse (anedonia), acompanhados de sintomas acessórios cognitivos e vegetativos. Até mesmo Hipócrates (460-380 a.C), médico grego considerado o "pai da medicina", possuía uma definição para a depressão: "uma afecção sem febre, na qual o espírito triste permanece sem razão fixado em uma mesma ideia, constantemente abatido". De acordo com a 10ª edição da Classificação Estatística Internacional de Doenças (CID-10) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993) e o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013) – o termo “episódio depressivo” é utilizado para definir um quadro de depressão ativo. Os episódios depressivos podem ocorrer em vários transtornos mentais, incluindo a "depressão maior". A "depressão maior" caracteriza-se pela presença exclusiva de um ou mais episódios depressivos ao longo da vida. Os diagnósticos são sindrômicos, baseados num conjunto de sinais e sintomas que permite diagnosticar um determinado quadro, definindo conduta e prognóstico. O quadro 4 resume os critérios do sistema do DSM para um episódio depressivo.

Quadro 4. Resumo dos critérios diagnósticos para um episódio depressivo maior no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

No mínimo 5 dos sintomas abaixo durante pelo menos 2 semanas, estando necessariamente presente humor deprimido (1) ou perda do interesse ou prazer (2).

- (1) humor deprimido
- (2) diminuição do interesse ou prazer
- (3) perda ou ganho de peso, ou diminuição ou aumento do apetite
- (4) insônia ou hipersonia
- (5) agitação ou retardo psicomotor
- (6) fadiga ou perda de energia
- (7) sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada
- (8) capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se, ou indecisão
- (9) pensamentos de morte recorrentes ou ideação suicida

Os sintomas causam sofrimento ou prejuízo de funcionamento, não se devem a efeitos de uma substância ou condição médica geral, e não são mais bem explicados por luto.

Fonte: AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013.

A depressão também pode ser secundária a doenças médicas gerais. Não existem marcadores específicos para definir se um episódio depressivo é secundário, no entanto os sistemas de classificação recomendam que o julgamento clínico seja guiado por alguns indícios, verificando a associação entre depressão e a doença de base, uma relação temporal compatível entre a evolução da doença de base e o início ou eventual melhora ou piora do quadro depressivo e a ausência de história pessoal ou familiar. Em termos de pesquisa da depressão normalmente são utilizados os critérios de um episódio depressivo primário, apesar de a distinção entre depressão primária e secundária ser útil no atendimento clínico.

A prevalência de depressão maior na população geral, ao longo da vida, é ao redor de 15% (ANDRADE et al. 2002, KESSLER et al. 2005). Frequentemente, vítimas de TCE são acometidos de depressão, mas as taxas sofrem variação nas diferentes populações (em cada continente). Estudos que avaliaram pacientes com TCE moderado e grave admitidos consecutivamente descreveram taxas de prevalência de depressão de 18 a 36% (McCLEARY et al. 1998; SEEL et al. 2003; DIKMEN et al. 2004; GOULD et al. 2011). Holsinger e colaboradores observaram que as taxas de depressão permanecem elevadas mesmo várias décadas após o TCE (HOLSINGER et al., 2002). Além disso, a incidência de um primeiro episódio depressivo é muito elevada nos primeiros meses e anos após o trauma (JORGE et al. 2004; WHELAN-GOODINSON et al. 2009; DIAZ et al. 2012). Desse modo, é possível

afirmarmos que a depressão é uma sequela direta do TCE, ou no mínimo o TCE é um importante fator de risco para o desenvolvimento de depressão.

O aparecimento da depressão após episódio de TCE pode envolver tanto fatores psicossociais como biológicos. Diversos pesquisadores demonstraram a presença de associação com baixo nível educacional e econômico, desemprego, insatisfação com o trabalho e falta de relações pessoais próximas (GOMEZ-HERNANDEZ et al. 1997; SEEL et al. 2003, DIKMEN et al. 2004, JORGE et al. 2004, WHELAN-GOODINSON et al. 2008). Em termos fisiopatológicos, estudos apontam a associação de depressão pós-TCE com lesões em regiões frontais e temporais, incluindo o córtex pré-frontal dorsolateral, córtex cingulado anterior, córtex orbitofrontal, hipocampo e giro parahipocampal (FEDOROFF et al. 1992, JORGE et al. 2004, CHEN et al. 2008).

Esses achados corroboram com os observados em estudos neuropsicológicos evidenciando prejuízos de atenção, velocidade de processamento, memória de trabalho e função executiva (JORGE et al. 2004; RAPOPORT et al. 2005).

1.5.2 Alteração de Personalidade

Personalidade refere-se a individualidade consciente, mas seu conceito na psicologia é um tema extenso e controverso. Quando tratamos das lesões cerebrais, uma boa definição se baseia no fato de a personalidade representar o conjunto de padrões característicos e duradouros de sentimentos, pensamentos e ações de um indivíduo (CARVER/CONNOR-SMITH, 2010). Alteração de personalidade causada por lesões cerebrais são condições reconhecidas na neurologia, psiquiatria e neuropsicologia. O quadro 5 resume os critérios para o diagnóstico de alteração de personalidade devido a uma condição médica no sistema do DSM. O diagnóstico enfatiza mudanças duradouras em relação ao comportamento prévio, com tipos definidos de acordo com predominância de sintomas de apatia, desinibição comportamental, agressividade, labilidade afetiva, desconfiança ou uma combinação de manifestações. O diagnóstico também exige a presença de uma doença de base capaz de causar os sintomas e a exclusão de outros transtornos psiquiátricos que possam explicar o quadro clínico. No caso do TCE, a alteração de personalidade é característica do trauma grave, afetando de 33 a 60% dos sobreviventes e, muitas vezes, são

incapacitantes (PELEGRIN-VALERO et al. 2001; RAO et al. 2008; DIAZ et al. 2012).

Quadro 5. Resumo dos critérios diagnósticos de alteração de personalidade devido a uma condição médica geral no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

- Perturbação da personalidade representando uma alteração de um padrão característico prévio, persistente por pelo menos 1 ano.
- Existem evidências de que a perturbação é consequência direta de uma condição médica geral.
- Os sintomas causam sofrimento ou prejuízo de funcionamento e não são mais bem explicados por outro transtorno mental.

- Especificação do tipo:

Lábil: predomina a labilidade afetiva.

Desinibido: predomina o fraco controle dos impulsos.

Apático: predomina a apatia e indiferença.

Agressivo: predomina o comportamento agressivo.

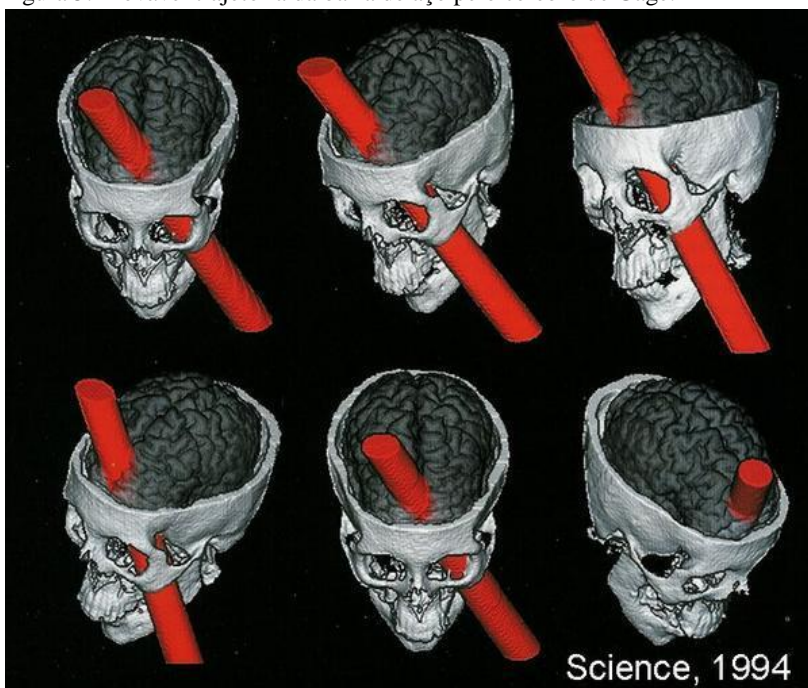
Paranóide: predomina a desconfiança e ideiação paranóide.

Combinado: predomina mais de um aspecto no quadro clínico

Fonte: AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013.

Um dos relatos mais famosos da história médica descreve o caso do paciente Phineas Gage, acometido pela síndrome de alteração de personalidade (O'DRISCOLL/LEACH, 1998). Gage sofreu um acidente durante a construção de uma ferrovia, em meados do século XIX, no qual uma barra de ferro atravessou seu crânio, lesionando os lobos frontais. Antes do acidente, era um operário padrão, socialmente bem adaptado e eficiente. A fala, memória e inteligência de Gage foram preservadas e ele teve como sequelas epilepsia, cegueira do olho esquerdo e paralisia facial à esquerda. No entanto, o fato que mais chamou atenção da comunidade médica, é que Gage evidenciou mudanças profundas de comportamento, tornando-se irresponsável, avesso às normas sociais e religiosas, impulsivo, inconstante e imaturo, a ponto de seus conhecidos declararem que “Gage deixou de ser Gage” (DAMASIO et al. 1994; O'DRISCOLL/LEACH, 1998). O caso foi marcante no estudo das bases neurais do comportamento e é considerado como uma das primeiras evidências científicas que indicavam que a lesão nos lobos frontais pode alterar a personalidade, emoções e a interação social.

Figura 5. Provável trajetória da barra de aço pelo cérebro de Gage.



Utilizando computação gráfica e técnicas de tomografia cerebral para calcular a provável trajetória da barra de aço pelo cérebro de Gage, Damasio et al descobriram que a maior parte do dano deve ter sido feito à região ventromedial dos lobos frontais. A fala e as funções motoras foram aparentemente preservadas, mas as mudanças no comportamento social observado em Phineas Gage provavelmente foram devidos a esta lesão.

Fonte: Imagem retirada do artigo DAMASIO, H. et al. 1994.

A fisiopatologia do TCE relaciona-se à lesão axonal por estiramento mecânico, podendo haver uma interrupção das conexões frontais. As regiões orbitofrontal e temporal anterior são mais acometidas por contusões, hematomas e hemorragias intracerebrais, estando assim intimamente relacionada a alteração de personalidade (GODEFROY et al. 2010). A existência de associação entre alteração de personalidade e dos danos nas regiões frontais do cérebro e prejuízos da função executiva é bem descrita mas os sintomas podem ocorrer com lesões em outras partes do cérebro, e muitas vezes não ocorrem mesmo após extenso dano frontal (LYKETSOS et al. 2004; DUFFAU, 2012). Os critérios do sistema do DSM não contemplam as alterações

cognitivas que frequentemente acompanham a alteração de personalidade, porém isso ocorre na CID-10, embora de modo bastante sucinto e inespecífico. Entretanto, uma nova categoria do DSM-5 denominada “transtorno neurocognitivo menor e maior devido a TCE” provavelmente é aplicável a uma grande proporção dos pacientes com alteração de personalidade devido a TCE, enfatizando assim os prejuízos cognitivos.

1.6. JUSTIFICATIVA

Condições neuropatológicas agudas, incluindo o TCE, estão entre as principais causas de deficiências neurológicas motoras e cognitivas no mundo, especialmente em adultos jovens em idade produtiva (25 a 45 anos, em média) (ROOZENBEEK et al. 2013). As principais causas destas lesões são acidentes automobilísticos, acidentes durante atividades recreativas, ferimento por arma de fogo, quedas e agressões físicas. Nos Estados Unidos, cerca de 1,4 milhões de pessoas procuram cuidados médicos por algum tipo de ferimento na cabeça todos os anos. Dessas, cerca de cinquenta mil vão a óbito, enquanto os sobreviventes experienciam perda das funções físicas e cognitivas, problemas de memória, depressão, ansiedade e estresse que diminuem a qualidade de vida e contribuem para o alto custo anual da manutenção destes pacientes (SCHWARZBOLD et al. 2008, CORONADO et al. 2011). No Brasil, a incidência anual de TCE é de aproximadamente 341 casos por 100.000 habitantes (MASINI 1994).

Transtornos psiquiátricos são frequentes em pacientes com TCE e estão associados à redução de qualidade de vida, estresse familiar e disfunção social e ocupacional (DIAZ et al. 2012). Os principais transtornos que afetam essa população são a depressão, que é frequente no TCE de qualquer gravidade, e a alteração de personalidade, que é característica do trauma grave (SCHWARZBOLD et al. 2008). O diagnóstico de depressão pode ser difícil em pacientes com TCE devido à sobreposição dos sintomas depressivos com outros problemas causados pelo trauma, principalmente em termos de manifestações somáticas, cognitivas e comportamentais (SEEL et al. 2010).

O processo inflamatório desenvolvido após TCE é intenso e acarreta em um comprometimento das funções normais do SNC. Verificamos que a ruptura da BHE leva ao acúmulo de leucócitos da circulação sistêmica, que iniciam liberação de citocinas pró-inflamatórias, proteases citotóxicas e espécies reativas de oxigênio, por sua vez, iniciam as funções imunológicas da glia (STAHEL et al. 2000).

Além disso, outras proteínas podem estar envolvidas no processo inflamatório pós TCE e no comprometimento prognóstico.

Nas últimas duas décadas, uma quantidade considerável de estudos clínicos e experimentais tem descrito uma associação entre ativação imune mediada por citocinas e o surgimento de sintomas depressivos. Pacientes portadores de enfermidades inflamatórias crônicas são acometidos por depressão com maior frequência, assim como indivíduos em tratamento com ativadores imunológicos (terapia com interferons, por exemplo) (RAMLACKHANSINGH et al. 2011). Mais ainda, estudos clínicos evidenciaram possível utilidade para anti-inflamatórios no tratamento da depressão (FARIDHOSSEINI et al. 2014) e estudos com animais investigaram a manipulação dos mecanismos bioquímicos e moleculares subjacentes ao fenômeno, indicando uma relação causal entre inflamação e depressão. Desse modo, é possível que a depressão em pacientes com TCE tenha uma base inflamatória e que a investigação de marcadores imunes tenha utilidade na determinação do prognóstico ou para futuros tratamentos específicos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a existência de associação dos níveis plasmáticos de neopterina, na fase aguda, e IL-10, nas fases aguda e crônica, como marcadores de depressão e alteração de personalidade decorrentes do traumatismo cranioencefálico grave (em média, 18 meses após TCE), visando contribuir com novas perspectivas para a área.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar avaliação prospectiva de pacientes consecutivamente admitidos por TCE grave no HGCR para coleta de dados sócio-demográficos e clínicos na fase aguda do TCE e verificar a associação com o prognóstico.
- Analisar possíveis associações dos níveis plasmáticos de IL-10 (fases aguda e crônica) como marcador de manifestações psiquiátricas (depressão e alteração de personalidade) associadas ao TCE.
- Verificar os níveis plasmáticos de neopterina, na fase aguda do TCE, e a associação com diagnóstico de depressão e transtorno de personalidade 18 meses (em média) após TCE.

3. METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo, observacional e prospectivo, foi realizado como parte do projeto “Neurotrauma: bases fisiopatológicas, diagnóstico, fatores prognósticos e tratamento”, do Núcleo de Pesquisas em Neurologia Experimental e Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os dados clínicos, demográficos, neurocirúrgicos, radiológicos e as amostras laboratoriais foram coletados na fase aguda do TCE, de acordo com a rotina instituída como parte do nosso protocolo de pesquisa (de 2009-2011). Tais coletas foram realizadas na sala de emergência e durante a admissão na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Governador Celso Ramos (HGCR) em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, seguindo as diretrizes do estudo (MARTINS et al. 2009, SOARES et al. 2012).

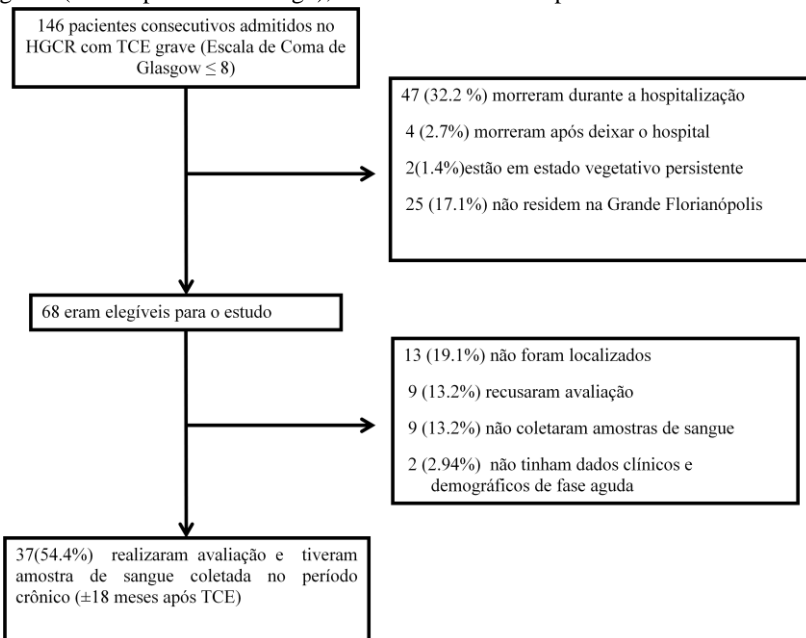
Foram incluídos no estudo os pacientes que apresentaram as seguintes características: a) TCE grave definido pela GCS com pontuação ≤ 8 ou evolução para essa pontuação nas primeiras 48 horas da admissão; b) idade \geq a 16 anos na admissão; c) ser residente na região metropolitana de Florianópolis. Foram excluídas vítimas de acidente por arma de fogo devido as peculiaridades fisiopatológicas e clínicas deste tipo de TCE (SANTIAGO et al. 2012). A inclusão exclusiva de pacientes com TCE grave objetivou tornar a amostra mais homogênea, conferindo maior credibilidade aos resultados do nosso estudo.

Concluídos 12 meses após o TCE, foram realizados contatos telefônicos e agendamos avaliações psiquiátricas individuais, no ambulatório do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU), da UFSC. No mesmo dia da entrevista com os psiquiatras, pacientes que concordaram em participar desta fase do estudo foram submetidos também a avaliações neuropsicológica, de qualidade de vida, endocrinológica e nova coleta de sangue (5mL). As amostras de sangue foram processadas, aliquotadas e armazenadas (freezer -80°C) para posterior determinação das proteínas do estudo. O tempo médio de congelamento foi de 8 meses.

3.2 AMOSTRA

Para as dosagens agudas, os pacientes foram incluídos no estudo de forma consecutiva, de acordo com os critérios de inclusão. Para a fase crônica, a seleção dos pacientes se encontra detalhada na Figura 6.

Figura 6. Curso da amostra para avaliação psiquiátrica e de qualidade de vida dos pacientes admitidos consecutivamente na UTI do HGCR devido a TCE grave (exceto por arma de fogo), 18 meses em média após o trauma.



Fonte: Flávia Mahatma Schneider Soares

Dosagens das interleucinas e PCR de fase aguda foram realizadas utilizando a mesma abordagem (SOARES et al. 2012). Para as dosagens de NPT, a metodologia se encontra descrita naquele tópico.

3.3 ASPÉCTOS ÉTICOS

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da UFSC, sob o registro 163/05 (anexo A). Para participarem do estudo, tanto na fase aguda como na crônica, os pacientes e/ou pelo menos um de seus familiares assinaram um termo de

consentimento livre e esclarecido, nos permitindo a utilização dos dados neste estudo.

3.4 MEDIDAS

3.4.1 Gravidade do Trauma

A gravidade do trauma foi considerada de acordo com a GCS (JENNETT et al. 1976). No momento do atendimento médico, pacientes apresentando valores da GCS menores ou igual a 8, ou que evoluíssem para essa pontuação dentro das primeiras 48 horas após a admissão foram classificados como TCE grave e incluídos no nosso estudo.

A estimativa do tempo do PTA foi realizada retrospectivamente durante a avaliação de fase tardia e foi baseada na primeira lembrança clara do paciente após o TCE. Para a maioria dos pacientes um familiar próximo foi também questionado em relação à cronologia dos eventos e recuperação da memória episódica autobiográfica do paciente. O período que compreende esse momento e o TCE seria correspondente à duração do PTA, que foi categorizada em menor ou maior que um mês de duração.

3.4.2 Avaliação de Fase Aguda

Após concordância do responsável pelo paciente em participar do estudo, foram coletadas amostras de sangue o mais breve possível após o TCE (primeiro dia) e nos dois dias subsequentes (segundo e terceiro dias após o TCE). De cada paciente, coletaram-se duas amostras de sangue de 5 mL cada, com EDTA e sem EDTA. As amostras de soro e plasma foram então centrifugadas (centrífuga modelo Celm Combat), aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C.

3.4.2.1 Coleta das Variáveis

Foram coletadas prospectivamente as variáveis demográficas, clínicas, neurocirúrgicas, radiológicas e laboratoriais durante a interação do paciente, como parte do protocolo de pesquisa (MARTINS et al. 2009). A seguir, é possível acompanhar a sistemática do processo de coleta:

- a) Na admissão, segundo e terceiro dias após a admissão: foram coletados os dados da escala de coma de Glasgow, sinais vitais, exame pupilar, gasometria arterial, hemograma, glicemia, sódio, potássio, uréia, creatinina, função hepática. Em pacientes com uso de ventilação mecânica: frequência respiratória, fração de oxigênio inspirado (FI02), pressão expiratória final positiva (PEEP) estes dados foram anotados e controlados durante as análises estatísticas.
- b) Na admissão e durante a internação: nome, idade, sexo, estado civil, escolaridade, renda familiar, histórico documentado de doença psiquiátrica, data e hora do TCE, data e hora de admissão em UTI, traumatismos associados, ressuscitação hemodinâmica, neurocirurgia, tempo de neurocirurgia, presença de trauma associado, tomografia computadorizada na admissão (escala de Marshall), tipo de lesão intracraniana, reposição de volume na admissão, transfusão sanguínea, monitorização de pressão intracraniana (PIC), traqueostomia, coma induzido, administração de drogas vasoativas, oximetria do bulbo jugular, infecção respiratória, infecção urinária, septicemia, síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA). Os pacientes foram controlados para a presença de traumas associados (membros, espinhal, abdominal) e presença ou não de neurocirurgia (e tempo de sedação associado).
- c) No momento da alta, data e horário (alta/óbito).

3.4.2.2 Análise dos Marcadores Inflamatórios

Determinação das Citocinas

A fim de investigar uma possível associação entre os níveis de citocinas e o tempo após a lesão provocada pelo TCE, prognóstico e a mortalidade foram medidas, por citometria de fluxo, as amostras dos pacientes. No plasma, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e TNF- α foram determinadas nas amostras de sangue coletadas no primeiro, segundo e terceiro dias de pacientes vítimas de TCE grave (SOARES et al. 2012). A escolha das amostras foi realizada de modo randomizado, cego para todas as variáveis de internação, exceto para a gravidade do trauma (pontuação CGS na admissão). Um citômetro de fluxo (FACSSCalibur, BD Biosciences, EUA) foi utilizado para determinação sérica de

citocinas usando o BD TM Cytometric Bead Array (CBA) Humano de citocinas Th1/Th2 (BD Biosciences, San Diego, CA). O kit CBA empregado permite a discriminação das seguintes citocinas: IL-2 (menor nível de detecção de 2,6 pg / mL), IL-4 (menor nível de detecção de 2,6 pg / mL), IL-5 (menor nível de detecção de 2,4 pg / mL), IL-10 (menor detecção do nível 2,8 pg / mL), IFN- γ (nível inferior de detecção 7,1 pg/ml e TNF- α (nível inferior de detecção 2,8 pg / mL) em uma única amostra. O processamento das amostras e a análise de dados foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras de soro foram incubadas com 6 beads de citocinas de captura e anticorpos de detecção PE-conjugados durante 3 h, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas e os dados foram obtidos por meio do citômetro de fluxo FACSScalibur (BD Biosciences, San Diego, CA). Os resultados das amostras foram gerados em formato gráfico e tabular usando o GraphPad Prism versão 5.01. Devido ao fato de que apenas IL-10 e TNF- α foram detectados no primeiro dia após TCE, foram medidos os níveis séricos dessas citocinas em maior número de casos. Foram estudados pacientes na fase aguda e crônica.

Determinação de Neoptերina

A associação entre a gravidade do TCE em pacientes adultos e os níveis plasmáticos NPT determinados foi investigada pelo método HPLC-FLD (cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a detecção de fluorescência (DE LUCAS et al. 2014). Foram incluídos 130 pacientes (119 do sexo masculino, 91.5%) com TCE grave (Escala de Coma de Glasgow ≤ 8), com média de 34 anos de idade ($\pm 1,5$ anos) admitidos consecutivamente no HGCR. Para fins de controle e comparação, foram incluídos no estudo pacientes que sofreram TCEs leves (n=8) e moderados (n=13). As dosagens foram realizadas no Laboratório da Dra Alexandra Lattini, no Centro de Ciencias Biológicas da UFSC. Foram avaliados somente pacientes na fase aguda, devido a dificuldades técnicas ocorridas durante o desenvolvimento da tese.

Determinação da PCR

O método utilizado para quantificação da proteína C reativa (PCR) foi o de quimioluminescência, lido no aparelho Immulite 2000, realizada no laboratório de análises clínicas do HU. Consideramos como inflamados pacientes cujos valores da proteína C reativa foram

superiores a 0,1mg/dL, de acordo com as referências do kit utilizado neste aparelho.

3.4.3 Avaliação de Fase Crônica

Foram determinados os níveis de citocinas (por CBA), e PCR (quimioluminescência) de acordo como descrito acima, sendo sempre realizados em duplicata. As amostras de sangue de fase crônica foram coletadas, processadas e aliquotadas no mesmo dia da consulta psiquiátrica (a partir de 12 meses após TCE). Durante a realização dos testes de fase crônica, as amostras de fase aguda foram descongeladas e reavaliadas para fins de análise de reprodutibilidade. Todas as dosagens laboratoriais, tanto de fase aguda como crônica, foram realizadas pela mesma pesquisadora (autora desta tese).

Dosagens de NPT não foram realizadas na fase crônica devido a mudança de metodologia do laboratório (passando de HPLC para ELISA). Como não pudemos ter acesso ao HPLC e não tínhamos verba para refazer as dosagens agudas por ELISA, sendo assim a diferença de técnica poderia influenciar nos resultados, optamos pela não realização das dosagens de fase crônica.

Determinação dos diferenciais de leucócitos foram realizados de forma padrão, executados no laboratório de análises clínicas do HU.

Nesta etapa do estudo foram realizadas análises neuropsicológicas e psiquiátricas.

3.4.3.1. Avaliação Psiquiátrica e Qualidade de Vida

A avaliação psiquiátrica foi realizada por dois psiquiatras integrantes do nosso grupo de pesquisa (Dr. M. L. Schwarzbald e Dr. A. P. Diaz), através de uma entrevista clínica estruturada e escalas de avaliação de depressão, descritas adiante. Na avaliação psiquiátrica o acompanhante permaneceu na sala na maioria dos casos e podia intervir quando pertinente e solicitado pelo pesquisador, como é costumeiro da entrevista psiquiátrica. Em alguns casos, a avaliação psiquiátrica foi realizada no domicílio do paciente.

Entrevista Clínica Estruturada para os Transtornos do Eixo I do DSM-IV

A Entrevista Clínica Estruturada para os Transtornos do Eixo I do DSM-IV (SCID-I) tem como objetivo identificar os principais transtornos mentais através da abordagem sistemática dos critérios

diagnósticos do DSM-IV (FIRST et al. 1996). A SCID-I é um instrumento semi-estruturado, já que muitas vezes utiliza perguntas abertas, que permitem respostas descritivas sujeitas a algum grau de interpretação pelo entrevistador. Faz parte da SCID-I uma avaliação preliminar na forma de uma anamnese sucinta para coleta de dados sócio-demográficos e histórico médico, bem como estabelecimento de vínculo com o paciente. A SCID-I abrange sintomas atuais e prévios, de acordo com os critérios diagnósticos de cada transtorno. No presente estudo utilizamos a versão validada no Brasil (TAVARES, 1996). Os seguintes diagnósticos foram contemplados: transtorno depressivo maior, transtorno bipolar I e II, esquizofrenia e outros transtornos psicóticos, abuso e dependência de substâncias, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno do pânico, transtorno do estresse pós-traumático, transtorno obsessivo-compulsivo e transtorno de adaptação. Vale lembrar que a SCID-I não contempla o diagnóstico de alteração de personalidade devido a uma condição médica geral. A SCID-I tem sido bastante utilizada como um “padrão-ouro” em pesquisa, guardadas as devidas limitações desse conceito na psiquiatria (SPITZER, 1983; SPITZER et al. 1992; FENNIG et al. 1994).

Escala de Depressão de Hamilton

A escala de depressão de Hamilton (HAM-D) (HAMILTON, 1960) é uma escala pontuada de acordo com a avaliação do entrevistador e tem ênfase nos sintomas somáticos e vegetativos da depressão. O objetivo primário da HAM-D é medir a intensidade dos sintomas: são bastante difundidas as pontuações de 8 a 13 para depressão leve, de 14 a 18 para depressão moderada, de 19 a 22 para depressão grave, e de 23 ou mais para depressão muito grave; no entanto, esses pontos de corte não são livres de controvérsia (FOURNIER et al. 2010; ZIMMERMAN et al. 2013). A escala também pode ser útil para o rastreamento da depressão e a definição de remissão clínica (LEENTJENS et al. 2000; ZIMMERMAN et al. 2013). No presente estudo, utilizamos a versão validada no Brasil, que contempla 17 itens (MORENO/MORENO, 1998).

Inventário de Depressão de Beck

O inventário de depressão de Beck (BDI) (BECK et al. 1961) é composto por 21 questões de múltipla escolha preenchidas pelo próprio paciente. O BDI valoriza os sintomas “cognitivos” da depressão, com diversas questões abordando o conteúdo do pensamento. Os pontos de corte originais para gravidade são os seguintes: menor que 10 para

depressão ausente ou mínima, de 10 a 18 para depressão leve a moderada, de 19 a 29 para depressão moderada a grave, e maior que 30 para depressão grave (BECK et al. 1988). No presente estudo utilizamos a versão de GORENSTEIN: uma versão validada no Brasil (GORENSTEIN/ANDRADE, 1996). Adotamos como abordagem realizar a leitura dos itens de forma neutra e pausada para os pacientes, deixando-os escolher livremente as opções que considerassem mais adequadas. A administração verbal do BDI é uma estratégia válida (GRIFFIN/KOGUT, 1988; SMARR/KEEFER, 2011).

Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão

A Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão (HADS) foi criada para rastrear transtornos depressivos e de ansiedade em pacientes com doenças médicas gerais, diferenciando-os do estresse emocional e dos sintomas físicos causados por essas doenças (ZIGMOND/SNAITH, 1983; SNAITH, 2003). Sendo assim, a HADS enfatiza os sintomas de anedonia e minimiza o peso dos sintomas somáticos e vegetativos da depressão. A HADS é composta por uma subescala de depressão (HADS-D) e uma subescala de ansiedade. (HADS-A) Originalmente, um ponto de corte de 8 ou mais foi proposto tanto na HADS-D como na HADS-A; esse ponto de corte foi validado em diversos estudos com doenças médicas gerais (BJELLAND et al. 2002). A HADS é autoaplicada, desenvolvida para a leitura do paciente; dessa maneira, é possível ao paciente ler e selecionar as respostas, mas a aplicação verbal por um entrevistador também pode ser feita (SNAITH, 2003, SMARR/KEEFER, 2011). Neste trabalho, utilizamos a versão validada no Brasil (BOTEGA et al., 1998), com a abordagem de ler os itens para os pacientes, de modo análogo ao feito com o BDI.

Diagnóstico de alteração de personalidade devido a TCE

O diagnóstico de alteração de personalidade devido a TCE foi feito de acordo com os critérios do DSM-IV-TR (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000), anteriormente mostrados no quadro 3. Ao final de cada avaliação psiquiátrica, os entrevistadores haviam adquirido um conhecimento detalhado do quadro do paciente, possibilitando-lhes a realização do diagnóstico baseado na melhor estimativa (LECKMAN et al., 1982; SPITZER, 1983; ABORAYA et al., 2005). Nesse momento, questões abertas adicionais eram feitas aos pacientes e acompanhantes para o esclarecimento dos critérios diagnósticos específicos, se necessário. Por exemplo, um familiar poderia ser inquirido se ele acreditava que a personalidade do paciente

havia mudado após o TCE, o que seria exatamente essa mudança, como se manifestava, e quando havia começado. Isso permitia ao entrevistador identificar manifestações dos tipos específicos de alteração de personalidade e verificar a ocorrência de uma relação temporal precoce com o trauma e de um caráter duradouro dos sintomas, características esperadas para o transtorno. Como a SCID-I já havia sido aplicada, o entrevistador também era capaz de descartar ou julgar clinicamente outros transtornos psiquiátricos que pudessem causar os sintomas de alteração de personalidade.

Utilização de antidepressivos

Os psiquiatras do grupo (M.L.S e A.P.D.) investigaram a utilização de medicação antidepressiva por parte dos pacientes sobreviventes nos períodos anteriores e posteriores (até a data das avaliações) ao TCE, para garantir a confiabilidade das análises realizadas.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas utilizando o programa SPSS 20.0 (Chicago, IL, USA).

Para avaliar a associação entre as variáveis clínicas, sócio-demográficas e psiquiátricas e inflamatórias (variáveis independentes) e o desfecho dicotômico “depressão” (variável dependente) realizaram-se uma série de análises univariadas. Variáveis contínuas foram analisadas pelo teste “t de Student” ou teste de Mann-Whitney, dependendo se a distribuição era normal de acordo com teste de Kolmogorov-Smirnov e se homocedasticidade estava presente no teste de Levene.

Variáveis categóricas foram analisadas por regressão logística binária. A magnitude da associação entre essas variáveis e o desfecho foi avaliada pela razão de chances (odds ratio (OR)) e seu respectivo intervalo de confiança de 95%. As variáveis cuja análise de associação com o desfecho resultou em um valor de “p” menor que 0,20 foram incluídas na análise de regressão logística binária múltipla. A magnitude da associação entre as variáveis independentes e o desfecho foi avaliada então pelo OR ajustado e seu respectivo intervalo de confiança de 95%. No modelo final, variáveis cuja associação com o desfecho resultou em um valor de p menor que 0,05 foram consideradas significativamente associadas ao desfecho.

As análises de NPT foram realizadas por ANOVA (variáveis contínuas) e teste qui-quadrado (variáveis categóricas).

4. RESULTADOS

A tabela 1 descreve a análise univariada com dados clínicos, sócio-demográficos, psiquiátricos e inflamatórios em relação ao desfecho “depressão”. Os pacientes foram avaliados em uma média de 17,5 meses após o TCE grave. Os pacientes com depressão tiveram níveis séricos mais elevados de IL-10 quando comparados com pacientes sem depressão ($p = 0,03$), assim como uma menor razão $\text{TNF-}\alpha / \text{IL-10}$ ($p = 0,01$). Também foi observada uma tendência ($p = 0,07$) em relação à escala tomográfica de Marshall (da fase aguda), com os pacientes classificados com lesões mais graves (Marshall V e VI) apresentando menor frequência de depressão. Os pacientes com e sem depressão não se diferenciaram estatisticamente quanto ao uso de antidepressivos na época da avaliação ($p = 0,17$). Na análise multivariada foram incluídas IL-10, escore tomográfico de Marshall e uso de antidepressivos (tabela 2). A razão $\text{TNF-}\alpha / \text{IL-10}$ não foi incluída por tratar-se de uma função direta da IL-10.

No modelo utilizando a variável contínua dos níveis de IL-10, nenhuma variável permaneceu associada ao desfecho depressão. No modelo utilizando a categorização da IL-10 em três faixas de valores (menor que $0,5 \times 10^3$ pg/mL, entre $0,5$ e $0,9 \times 10^3$ pg/mL, e maior que $0,9 \times 10^3$ pg/mL) somente a IL-10 permaneceu independentemente associada com depressão. A categorização da IL-10 nessas faixas de valores foi previamente estudada na predição de mortalidade na fase aguda do TCE grave (SOARES et al. 2012).

Tabela 1. Análise univariada de dados demográficos, clínicos, radiológicos, psiquiátricos e imunológicos, de acordo com a ocorrência de depressão maior após o TCE grave

VARIÁVEIS	Todos pacientes <i>n</i> = 37 (%)	Depressão depois TCE		Odds ratio (95% IC)	<i>P</i>
		Sim <i>n</i> = 11 (29,7)	Não <i>n</i> = 26 (70,3)		
DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS					
ro					
Feminino	8 (21,6)	2 (25,0)	6 (75,0)	1,00	
Masculino	29 (78,4)	9 (31,0)	20 (69,0)	1,35 (0,23 – 8,03)	0,74
Idade no trauma, média (± EP)	30,5 (± 2,0)	31,9 (± 2,6)	29,9 (± 2,6)	NA	0,64
Anos de educação, média (± EP)	10,1 (± 0,8)	9,6 (± 1,3)	10,3 (± 1,0)	NA	0,67
Classificação de Marshal ^a					
I-II	8 (24,0)	4 (40,0)	4 (17,4)	1,0	
III-IV	8 (24,0)	3 (30,0)	5 (21,7)	0,6 (0,8 – 4,4)	0,61
V-VI	17 (52,0)	2 (30,0)	14 (60,9)	0,21 (0,03 – 1,4)	0,10
GCS da admissão ^b					
3 – 4	11 (40,0)	2 (18,2)	9 (81,8)	1,00	
5 – 6	10 (28,6)	2 (20,0)	8 (80,0)	3,38 (0,52 – 21,73)	0,20
7 – 8	14 (41,2)	2 (14,6)	12 (85,7)	0,17 (0,02 – 1,16)	0,07
Pupiais da admissão ^c					
Isocorica	27 (77,1)	9 (33,3)	18(66,7)	1,0	
Anisocorica	8 (22,9)	1 (12,5)	7 (87,5)	0.29 (0.29 – 2.69)	0.27

VARIÁVEIS	Todos pacientes <i>n</i> = 37 (%)	Depressão depois TCE		Odds ratio (95% IC)	<i>P</i>
		Sim <i>n</i> = 11 (29,7)	Não <i>n</i> = 26 (70,3)		
Doença crônica^d					
Sim	7 (18,9)	3 (42,9)	4 (57,1)	1,00	
Não	30 (81,1)	8 (26,7)	22 (73,3)	2,06 (0,38 – 11,31)	0,40
Meses após TCE, média (± EP)	17,5 (1,0)	18,6 (2,0)	17,1 (1,1)	NA	0,46
PSIQUIÁTRICAS					
Abuso de substâncias ou dependência					
Sim	10 (27,0)	2 (20,0)	8 (80,0)	1,00	
Não	27 (73,0)	9 (33,3)	18 (66,7)	2,00 (0,35 – 11,44)	0,44
Mudanças de Personalidade					
Sim	9 (24,3)	3 (33,3)	6 (66,7)	1,00	
Não	28 (75,7)	8 (28,6)	20 (71,4)	1,25 (0,25 – 6,26)	0,79
Uso de anti depressivos					
Sim	3 (8,1)	2 (66,7)	1 (33,3)	1,00	
Não	34 (91,9)	9 (26,5)	25 (73,5)	5,56 (0,15 – 2,23)	0,18
INFLAMATÓRIAS					
PCR, mediana (IQ) mg/l	1,57 (0,53 – 6,28)	1,20 (0,55 – 3,33)	2,16 (0,46 – 6,80)	NA	0,67
IFγ, mediana (IQ) x 10³ pg/ml	5,45 (1,24 – 71,30)	5,90 (0,25 – 276,65)	5,30 (2,56 – 79,50)	NA	0,74
IL-2, mediana (IQ) x 10³ pg/ml	0,60 (0,00 – 5,00)	0,48 (0,05 – 1,03)	0,80 (0,00 – 6,15)	NA	0,58

VARIÁVEIS	Todos pacientes <i>n</i> = 37 (%)	Depressão depois TCE		Odds ratio (95% IC)	<i>P</i>
		Sim <i>n</i> = 11 (29,7)	Não <i>n</i> = 26 (70,3)		
IL-4 , mediana (IQ) x 10 ³ pg/ml	0,60 (0,30 – 4,30)	0,52 (0,00 – 3,25)	0,60 (0,32 – 5,65)	NA	0,42
IL-5 , mediana (IQ) x 10 ³ pg/ml	0,30 (0,03 – 1,60)	0,22 (0,00 – 1,45)	0,37 (0,09 – 1,60)	NA	0,42
IL-10 , mediana (IQ) x 10 ³ pg/ml	0,13 (0,01 – 0,95)	0,90 (0,08 – 1,07)	0,07 (0,01 – 0,78)	NA	0,03
TNFα , média (± EP) 10 ³ pg/ml	1,15 (± 0,17)	1,04 (± 0,26)	1,19 (± 0,21)	NA	0,68
Razão TNFα / IL-10 , mediana (IQ)	3,79 (1,36 – 27,04)	1,41 (0,60 – 3,26)	8,46 (2,06 – 42,67)	NA	0,01
Leucócitos , (x 10 ³ /mm ³) média (± SE)	6,55 (± 0,31)	6,30 (± 0,52)	6,67 (± 0,39)	NA	0,59
Neutrófilos (%), média (± EP)	55,55 (± 1,56)	54,16 (± 2,84)	56,18 (± 1,89)	NA	0,56
Linfócitos (%), média (± EP)	32,12 (± 1,67)	33,97 (± 2,80)	31,28 (± 2,08)	NA	0,46
Monócitos (%), média (± EP)	7,71 (± 0,55)	8,40 (± 0,78)	7,42 (± 0,71)	NA	0,42
Eosinófilos (%), média (± EP)	3,15 (± 0,42)	2,92 (± 0,86)	3,26 (± 0,48)	NA	0,71
Basófilos (%), mediana (IQ)	0,36 (0,14 – 0,80)	0,60 (0,36 – 0,71)	0,21 (0,10 – 0,95)	NA	0,32

a CT não foi classificada em 2 pacientes sobreviventes.

b Escala de Coma de Glasgow não foi documentada na admissão em 2 pacientes sobreviventes.

c Pupilas não puderam ser classificadas em 3 casos devido ao trauma ocular sobreviventes.

As variáveis categóricas foram analisadas por regressão logística binária mostrando a razão de chances e 95% de intervalo de confiança.

As variáveis contínuas são apresentados em média (EP) ou mediana (intervalo IQ), dependendo da distribuição de normalidade, e foram analisados pelo Teste "t" de Student ou teste de Mann-Whitney.

Tabela 2. Análise multivariada (regressão logística binária) incluindo a classificação tomográfica de Marshall da fase aguda e o uso de antidepressivos e níveis séricos de IL-10 (contínuos e categóricos) da fase crônica de TCE grave.

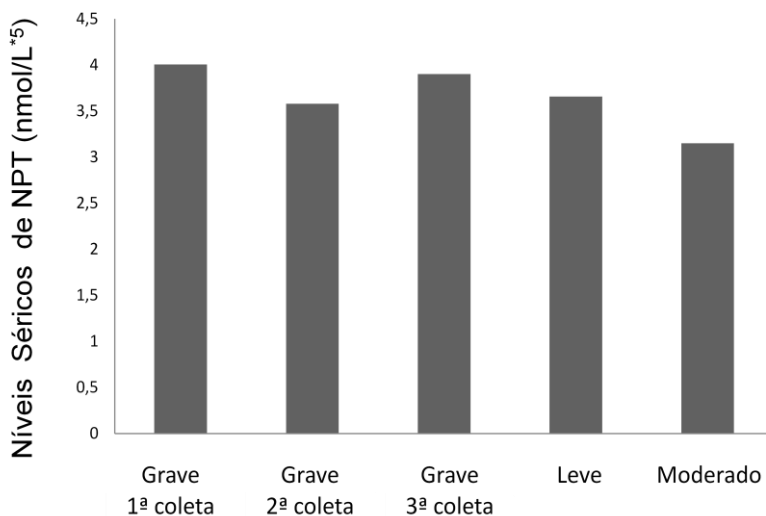
MODELO	Depressão após TCE		Razão de chances (IC 95%)	P
	Sim <i>n</i> = 10 (29,4%)	Não <i>n</i> = 24 (70,6%)		
Classificação de Marshall				
I-II	5 (50,0%)	5 (20,8%)	1,00	
III-IV	3 (30,0%)	7(29,2%)	0,49 (0,07 – 3,59)	0,48
V-VI	2 (20,0%)	12 (50,0%)	0,14 (0,02 – 1,21)	0,07
Uso de antidepressivos				
Sim	2 (20,0%)	1 (4,2%)	1,00	
Não	8 (80,0%)	23 (95,8%)	0,11 (0,01 – 1,98)	0,13
IL-10 , mediana (IQ) x 10 ³ pg/ml	0.13 (0.01 – 0.95)	0.90 (0.08 – 1.07)	2,55 (0,76 – 8,52)	0,32
Classificação de Marshall				
I-II	5 (50,0%)	5 (20,8%)	1,00	
III-IV	3 (30,0%)	7(29,2%)	0.43 (0.07 – 2.68)	0,64
V-VI	2 (20,0%)	12 (50,0%)	0.17 (0.02 – 1.16)	0,11
Uso de antidepressivos				
Sim	2 (20,0%)	1 (4,2%)	1,00	
Não	8 (80,0%)	23 (95,8%)	5.56 (0.45 – 68.94)	0,11
IL-10 , valor x 10 ³ pg/mL				
< 0,5	3 (30,%)	15 (62,5%)	1,00	0,09
0,5 – 0,9	2 (20,0%)	4 (16,7%)	5,29 (0,33 – 83,79)	0,24
> 0,9	5 (50,0%)	5 (20,8%)	10,60 (1,29 – 87,07)	0,03

Fonte:SPSS

Ao analisarmos as concentrações séricas de NPT (expressas em nmol/L), durante a fase aguda, não encontramos diferenças estatisticamente significativas de acordo com a gravidade do TCE.

(ANOVA, $p=0,42$) As amostras foram coletadas em média 11h (6-19h) após o TCE em 140 pacientes. Eles foram segregados de acordo com a gravidade do trauma. Paciente leves ($n=8$), moderados ($n=13$), graves que sobreviveram ($n=67$) e graves com óbito ($n=42$) não tiveram diferenças estatisticamente significantes dos índices de neopterina. Esses dados podem ser visualizados na figura 7.

Figura 7. Níveis séricos de NPT nos pacientes vítimas de TCE.



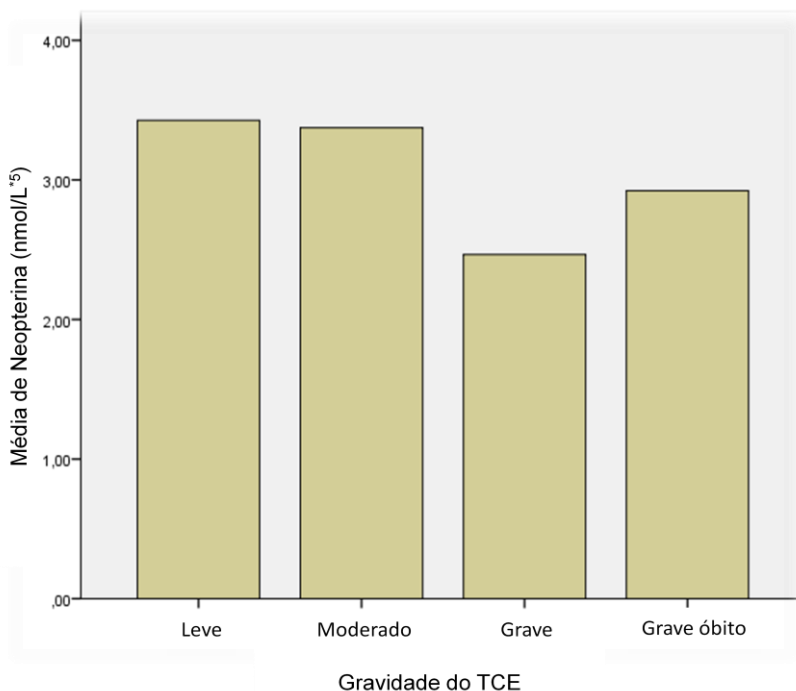
A primeira, segunda e terceira coleta de sangue foram coletadas respectivamente 11h (IQ 6–19h), 30h (IQ 24–37h) e 72 h (IQ 55–78h) horas depois do TCE.

Fonte:SPSS

Não houve associação dos níveis séricos de neopterina com a gravidade do TCE ou o tempo da coleta. Dados foram expressos em média.

Além disso, os níveis plasmáticos de NPT não se mostraram associados com a mortalidade (ANOVA, $p = 0.82$). Na figura 8 podemos observar a comparação entre os níveis séricos de NPT em pacientes vítimas de TCE.

Figura 8. Comparação entre os níveis séricos de NPT em pacientes vítimas de TCE.



Os níveis séricos de NPT dos pacientes não apresentaram correlação com o estado de gravidade ou a letalidade do TCE. Dados foram expressos em média. Fonte:SPSS

Como não encontrou-se diferenças estatísticas entre a gravidade ou letalidade do TCE com os níveis séricos de neopterina, uma comparação destes níveis de NPT com as variáveis clínicas e demográficas foi realizada (dados não mostrados). Durante essa comparação não houveram diferenças estatisticamente significantes ($p \geq 0,20$) no que diz respeito as variáveis clínicas, demográficas, laboratoriais e neurocirúrgicas com a gravidade do trauma e a relação dos níveis séricos de NPT.

5. DISCUSSÃO

É amplamente difundido na literatura que as vítimas de TCE são especialmente homens com idade abaixo de 45 anos (MASINI et al. 1994, MARTINS et al. 2009, FEIGIN et al. 2013). Os dados apresentados no presente trabalho revelaram que 78,4 % das vítimas de TCE grave eram do gênero masculino e tinham idade média de 31 anos e acidentes de trânsito foram as principais causas de TCE (62,7%) (dados não mostrados). Uma vez que, no presente estudo os pacientes foram arrolados consecutivamente (e não provenientes de um centro de reabilitação ou um ambulatório de referência), pode-se afirmar que as frequências encontradas são uma boa estimativa de prevalência na população específica de sobreviventes de TCE grave.

Esta pesquisa mostra que a frequência do aparecimento dos transtornos psiquiátricos após TCE grave foi compatível com estudos prévios e indicou que a depressão e a alteração de personalidade são as principais sequelas do TCE. Uma incidência de 29,7% de depressão 18 meses após o TCE grave foi obtida no presente estudo, corroborando com outros achados da literatura (McCLEARY et al.1998, SEEL et al. 2003, GOULD et al. 2011). Wheelan-Goodinson e colaboradores, por exemplo, também avaliaram pacientes vítimas de TCE (45 vítimas de TCE grave, de um total de 100 pacientes) e relataram que 46% deles apresentaram depressão maior de acordo com a SCID-I; em cerca de 70% dos casos, o transtorno se manifestou pela primeira vez após o TCE (WHEELAN-GOODINSON et al. 2009). Outro trabalho avaliou 91 pacientes consecutivamente admitidos por TCE de diferentes gravidades (23,2% com trauma grave) e encontraram uma incidência de depressão de 33% no primeiro ano após o trauma (JORGE et al. 2004). No presente estudo, em mais de 80% dos casos de depressão, os sintomas se manifestaram pela primeira vez após o TCE. Esse surgimento desproporcional de novos casos em um período de tempo relativamente curto sugere que o TCE é uma causa de depressão, como apontado por vários autores (VAN REEKUM et al. 2000; JORGE et al. 2004; WHELAN-GOODINSON et al. 2009).

Muito se sabe que o prejuízo cognitivo pode afetar o comportamento do indivíduo além de limitar o funcionamento em áreas sociais e recreativas, levando a um prejuízo na readaptação psicossocial e na sua independência (PRIGATANO 1992, DRAPER et al. 2008). Sendo assim, este trabalho comparou as características demográficas e indicadores da gravidade do trauma; no entanto, não foram observadas diferenças quando foram comparados os pacientes vítimas de TCE com

e sem depressão. Existem poucos estudos comparando o perfil cognitivo de pacientes com TCE com e sem depressão, mas diferenças já foram descritas (JORGE, et al. 2004; RAPOPORT et al. 2005).

O conceito de dualidade de neuroinflamação no TCE é agora um aspecto bem reconhecido da pesquisa de traumas. As conclusões que podem ser obtidas na literatura até o momento, em grande parte, giram em torno da noção de que a resposta imune do SNC é dicotômica, em suas múltiplas facetas: quer seja a reação pró versus anti-inflamatória, como na lesão focal versus difusa, a resposta central versus resposta periférica, ou quadro agudo em relação ao quadro crônico (SOARES et. al. 2012, CZEITER et al. 2012, GULLO et al. 2011, NOLAN 2005 CSUKA et al. 1999). Para que sejam propostas as opções de tratamento viável para o paciente vítima de TCE, a importância de se compreender a resposta imune celular e suas interações, não pode ser subestimada.

O estabelecimento de uma interação bidirecional entre os sistemas imunológico e nervoso central é uma das descobertas mais notáveis das últimas décadas. Estes dois sistemas realizam funções extremamente diferentes, mas um crescente corpo de evidências mostra que ambos compartilham mediadores comuns, incluindo citocinas e seus receptores. Portanto, a expressão alterada destas moléculas, desencadeada por um dos sistemas, pode influenciar o outro de uma forma recíproca (WRONA 2006). Como consequência, uma ruptura nesta interação (SNC - sistema imune) foi causalmente implicada em características neuropatológicas associadas a vários transtornos psiquiátricos, particularmente depressão (IRWIN/MILLER 2007).

A depressão é uma doença heterogênea, com um conjunto variável de sintomas, diversos cursos da doença e respostas inconsistentes ao tratamento. A etiologia da depressão ainda é controversa, e várias teorias surgiram para explicar. Tendo em conta a comunicação entre os sistemas imunológico e nervoso central, Smith, no início de 1990, propôs um papel das citocinas na depressão (SMITH 1991). A "teoria citocina da depressão", que tem sido amplamente estudada nas últimas duas décadas, expõe que a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias está associada com a patogênese da depressão. De fato, vários estudos mostraram um aumento significativo na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , IFN- γ , e TNF), entre os pacientes deprimidos (RAISON et al. 2006, MAES 1995, ANISMAN et al. 1999, CAPURON/MILLER 2004). No entanto, no presente estudo não encontrou-se tal associação.

Embora a maioria dos estudos sobre a "teoria de citocinas de depressão" estar centrada no aumento dos níveis de citocinas pró-

inflamatórias, o papel das citocinas anti-inflamatórias foi recentemente analisado. IL-10, uma das citocinas anti-inflamatórias mais importantes, provou ser relevante na depressão. Mesquita e colaboradores (2008) demonstraram que animais transgênicos para IL-10 apresentaram um comportamento depressivo com diminuição no TNF em comparação com animais wild type (WT). Além disso, relataram que a modulação da IL-10 apresenta impactos sobre alterações psicofisiológicas frequentemente observadas em depressão (MESQUITA et al. 2008). O atual estudo aborda uma possível tentativa de compensação das respostas pró/anti-inflamatória pelos pacientes vítimas de TCE, já que os pacientes avaliados tiveram níveis elevados de IL-10 (anti-inflamatória).

Ainda neste contexto, este trabalho revelou que os níveis elevados de IL-10 dos pacientes vítimas de TCE grave esteve independentemente associado ao aparecimento de depressão pós TCE ($p = 0,03$), bem como a razão entre citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- α /IL-10) ($p = 0,01$). Dessa maneira, acredita-se que IL-10 diminui neuroinflamação local (SNC) enquanto, causa imunossupressão no paciente sistemicamente. Isto é especialmente importante nos pacientes politraumatizados que envolvem resposta sistêmica e podem estar contribuindo para a lesão cerebral secundária (por exemplo, aumentando a suscetibilidade à infecção), apesar do fato de que as citocinas anti-inflamatórias reduzirem danos cerebrais secundários mediados por neuroinflamação. Outra particularidade da interação entre eventos imunológicos intracerebrais e sistêmicos é que o aumento da produção de citocinas no SNC pode render um melhor resultado de reposta local, mas a produção sistêmica pode agravar o resultado global, inclusive a longo prazo (IRWIN/MILLER 2007).

Embora seja cada vez mais claro que a modulação da IL-10 pode levar a mudanças no comportamento normal de humanos e animais, os mecanismos por trás dessas alterações ainda devem ser elucidados. Deve-se considerar várias vias através das quais IL-10 influenciaria o comportamento. Uma das hipóteses mais óbvias é o impacto desta citocina anti-inflamatória sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Na verdade, é admissível que a ausência de IL-10, em murinos nocautes para IL-10 (IL-10KO), leva a um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias que podem, de acordo com a "teoria citocina da depressão", desencadear a depressão. Este mecanismo também poderia explicar a anulação do comportamento depressivo em animais IL-10KO mediante a administração de IL-10 (MESQUITA et al. 2008), como a IL-10 é conhecido por inibir a

expressão de citocinas pró-inflamatórias (MOORE et al. 2001). Mais estudos são necessários para definição clara de como é possível a presença de IL-10 induzir a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias em regiões específicas do cérebro, que podem ser refletidas no soro. Uma abordagem ideal, para estudos futuros, deverá envolver a coleta de amostras de líquido e sangue bulbo jugular para avaliação dos processos inflamatórios diretamente na região afetada (SNC), uma vez que, os processos inflamatórios ativados podem influenciar vários aspectos da função do SNC. Dentre estas funções, é fundamental incluir o metabolismo de neurotransmissores, função neuroendócrina e processamento de informações que levem a mudanças de comportamento em humanos, especialmente relacionadas a alterações cognitivas e psiquiátricas (como a depressão e alteração de personalidade) (IRWIN/MILLER 2007).

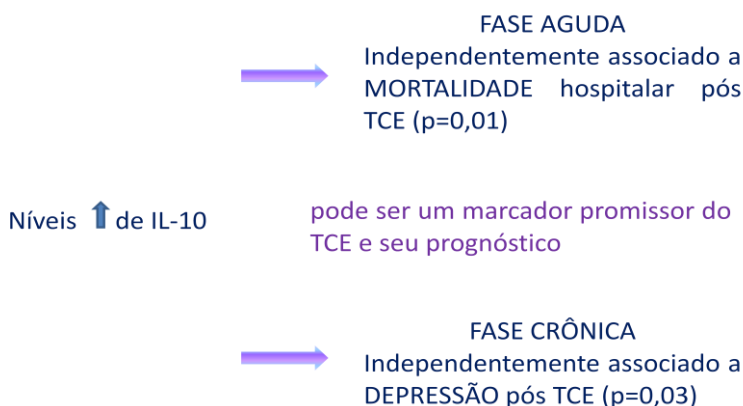
A IL-10 tem mostrado prevenir a morte celular de células da glia (PAHAN et al. 2000, STRLE et al. 2002, BACHIS et al. 2008) para aumentar a sobrevivência de neurônios (BACHIS et al. 2008). Uma vez que um aumento na apoptose neuronal no hipocampo foi associada com a depressão em modelos animais (LUCASSEN et al. 2001), esta função putativa de IL-10 no aumento da sobrevivência neuronal deve ser investigada como um dos possíveis mecanismos de ação na prevenção de comportamento depressivo semelhante em humanos.

A observação de que animais IL-10KO mostram um aumento da supra-renal e uma diminuição dos pesos do timo (MESQUITA et al. 2008) apresenta uma outra alternativa para o mecanismo de ação de IL-10 na depressão: a modulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). De fato, mostrou-se que, mesmo em condições basais, animais IL-10KO têm níveis mais elevados de corticosterona e que, na presença de um estressor o aumento deste hormônio é ainda mais acentuado do que nos WT (SMITH et al. 1999). Estes resultados sugerem fortemente que a IL-10 pode ter um efeito regulador no eixo HPA. Paradoxalmente, no hipotálamo e na pituitária, a IL-10 parece ter o mesmo efeito já descrito para algumas citocinas pró-inflamatórias (TURNBULL/RIVIER 1999), que é uma regulação positiva do fator de libertação da corticotropina e a produção de ACTH, respectivamente (HUGHES et al. 1994, STEFANO et al. 1998). Deve ser notado que, embora os estudos no hipotálamo e na pituitária foram apenas realizados *in vitro*, a ação inibidora de IL-10 na produção de corticosterona pela glândula supra-renal é um resultado mais consistente, uma vez que se baseia na produção *in vitro* e *in vivo*. Levando-se em conta que a depressão está muitas vezes associada com a hiperatividade do eixo

HPA (RAISON/MILLER 2003), se a hipótese de que a IL-10 tem um papel central na modulação da homeostase do eixo HPA, que é suscetível de ter um impacto sobre a etiologia da depressão.

Soares e colaboradores demonstraram que os níveis de IL-10, mas não os níveis de TNF- α , correlacionam-se com CSG da admissão e estão independentemente associados com a mortalidade hospitalar em pacientes com TCE grave (SOARES et al. 2012). Como já demonstrado em outras populações, o aumento inicial de IL-10 após o TCE evolui para níveis mais baixos nos primeiros três dias após a lesão (KITA. et al. 1997, MAIER et al. 2005). A associação entre a maior concentração sérica de IL-10 e os níveis de mortalidade por TCE foi demonstrada anteriormente por Bell et al. em crianças (BELL et al. 1997) e adultos com lesão corporal, incluindo alguns pacientes sem TCE (SHIOZAKI et al. 2005), mas estes dados não foram confirmados por Dziurdzik e colaboradores em pacientes adultos com TCE (DZIURDZIK et al. 2004). Os achados deste estudo indicam que a IL-10 pode ser um marcador promissor do TCE e seu prognóstico, já que o aumento dos níveis de IL-10 indicam pior prognóstico de pacientes com TCE grave na fase aguda (mortalidade hospitalar) e fase crônica do TCE (depressão). Acredita-se, desta forma, que os níveis aumentados de IL-10 nos pacientes TCE grave deprimidos seria uma compensação por um estado inflamatório encefálico, que por sua vez poderia induzir sintomas depressivos. Um resumo dos dados obtidos em relação a IL-10 é apresentado na Figura 9.

Figura 9: Achados referentes a IL-10. Resumidamente os resultados obtidos no presente estudo apresentaram associação entre níveis elevados de IL-10 com a mortalidade hospitalar (fase aguda) e também ao aparecimento de depressão 18 meses após TCE.



Fonte: Flávia Mahatma Schneider Soares

A PCR, apesar de ter seus níveis elevados (indicando a presença de processo inflamatório, tanto em fase aguda como fase crônica) não indicou associação com o prognóstico de alterações psiquiátricas ($p=0,67$). Estes dados corroboram com os achados de SU e colaboradores (SU et al. 2014), que investigaram TCE moderado e concluíram que os níveis elevados de PCR não foram associados com problemas fisiológicos persistentes, problemas psicológicos e de comprometimento cognitivo ($p = 0,146$). Tomados em conjunto com os achados que sugerem que as alterações do sistema imunológico podem ser variáveis de acordo com diferentes padrões de depressão, etiologias ou severidade dos sintomas depressivos, uma investigação mais aprofundada dos mecanismos biológicos é requerida para validar estes resultados.

Durante esta pesquisa, estudos com NPT não mostraram associação dos níveis séricos da proteína com a gravidade do TCE ou o tempo da coleta. Os níveis plasmáticos de NPT também não se mostraram associados com a mortalidade ($p = 0.82$). Apesar de o Estresse Oxidativo estar envolvido na fisiopatologia do TCE, estudos prévios do grupo (HOHL et al. 2014, THAIS et al. 2012) demonstraram que os níveis plasmáticos de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas não se mostraram como fatores preditivos associados à mortalidade hospitalar ou comprometimento cognitivo em pacientes com TCE. Esses dados corroboram com os achados atuais em relação a NPT, já que não encontrou-se associação dos níveis séricos de NPT com a gravidade do TCE, mortalidade, déficit cognitivo ou alguma das alterações psiquiátricas estudadas. Dessa forma, por se tratar de um marcador inflamatório tardio, os resultados não podem ser conclusivos e estudos de fase crônica devem ser incluídos em projetos futuros.

Dessa forma, parece que o processo neuroinflamatório ocorre simultaneamente em várias condições durante e depois do trauma, mas sua implicação com a gravidade e o desfecho ainda não é muito bem compreendida. Sendo assim, mais estudos de biomarcadores do TCE podem nortear estratégias terapêuticas para atenuar a lesão cerebral secundária e as sequelas a longo prazo.

Os atuais resultados devem ser analisados considerando todas as limitações da falta de seguimento e o tamanho da amostra, que é relativamente pequeno. No entanto, o nosso grupo, em estudo prévio (DIAZ et al. 2012), abordou a mesma coorte e não encontrou diferenças entre indivíduos avaliados e não avaliados na fase crônica em termos de variáveis sócio demográficas e clínicas da fase aguda desses pacientes.

Embora este fato não descarte o viés de seleção na fase crônica, nos mostra uma ausência de efeito das variáveis de fase aguda.

Outra limitação importante foi o fato de não terem sido realizadas dosagens de neopterinina de fase crônica. Devido a uma alteração da técnica empregada no laboratório colaborador (mudando de HPLC para ELISA) e a falta de recursos para realização de novas dosagens (de todo material da fase aguda novamente), realizou-se apenas as mensurações de fase aguda. Este fato, restringe os resultados do estudo e não permite uma experiência conclusiva, visto que a NPT é um marcador de inflamação de fase crônica (níveis alterados a partir de 96h) (HOFFMANN et al. 2003, KASKI 2003, LEDOCHOWSKI et al. 2001).

Apesar disso, o presente estudo foi um dos poucos a analisar marcadores inflamatórios na fase aguda nos pacientes (hospitalizados e com gravidade de TCE homogênea, admitidos consecutivamente no HGCR) e fazer associações com a fase crônica e avaliações psiquiátricas 18 meses após o TCE.

6. CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

A associação entre os níveis séricos de IL-10 em ambos os resultados, imediatos e a longo prazo, avaliados por habilidades motoras, cognitivas e avaliação psiquiátrica, bem como aspectos da qualidade de vida são pontos importantes a serem investigados em pacientes vítimas de TCE.

O aumento dos níveis de IL-10, mas não os de PCR, NPT ou TNF- α , evidenciaram associação com óbito (na fase aguda) e distúrbios psiquiátricos (depressão e alteração de personalidade) a longo prazo (18 meses após TCE).

Níveis de NPT (fase aguda) não demonstraram associação com a letalidade ou a gravidade do trauma. Estudos de fase crônica são indicados para maiores conclusões.

Aumento nos níveis de PCR não apresentaram relação estatística com os distúrbios psiquiátricos (depressão e alteração de personalidade) pesquisados.

A pesquisa de biomarcadores neuronais, axonais e astrogliais com valor prognóstico no TCE grave representa um campo promissor de progresso no manejo do TCE.

Se confirmados em outras populações, nossos achados indicam que a IL-10 pode ser um marcador importante no TCE e seu prognóstico. Futuras investigações devem ser realizadas para validar estes resultados e esclarecer quais os mecanismos biológicos subjacentes a estas relações.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABORAYA A. et al. The Validity of Psychiatric Diagnosis Revisited: The Clinician's Guide to Improve the Validity of Psychiatric Diagnosis. *Psychiatry*, 2 (9):48-55, 2005.

ANDRADE L. et al. Prevalence of ICD-10 mental disorders in a catchment area in the city of São Paulo, Brazil. *Soc Psychiatr Epidemiol*, 37(7): 316-25, 2002.

ANISMAN, H. et al. Endocrine and cytokine correlates of major depression and dysthymia with typical or atypical features. *Molecular Psychiatry*, 4(2):182–188, 1999.

BACHIS, A. et al., Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity, *Journal of Neuroscience*, 21(9):3104-3112, 2001.

BAIER-BITTERLICH G, FUCHS D, WACHTER H. 7,8-Dihydroneopterin upregulates interferon-gamma promoter in T cells. *Immunobiology* 196: 350–5, 1996.

BARZO P. et al. Magnetic resonance imaging-monitored acute blood-brain barrier changes in experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 85(6):1113–1121, 1996.

BECK AT, STEER RA, CARBIN MG. Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: twenty-five years of evaluation. *Clin Psychol Rev*, 8(1):77-100, 1988.

BECK AT. et al. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry*, 4:561-71, 1961.

BELL MJ. et al. Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma*. 14(7):451–457, 1997.

BENEDICTUS MR. et al "Cognitive and behavioral impairment in traumatic brain injury related to outcome and return to work." *Arch Phys Med Rehabil* 91:1436-41, 2010.

BENVENISTE EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 9(3–4):259–275, 1998.

BERGENDI L. et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, 65 (18): 1865–1874, 1999.

- BJELLAND I. et al. The validity of the Hospital Anxiety and Depression Scale. An updated literature review. *J Psychosom Res*, 52(2):69-77, 2002.
- BONDANELLI M, AMBROSIO MR, ZATELLI MC, DE MARINIS L, DEGLI UBERTI EC. Hypopituitarism after traumatic brain injury. *Eur J Endocrinol*. 152(5):679-91, 2005.
- BOTEGA NJ. et al. Validação da escala hospitalar de ansiedade e depressão (HADS) em pacientes epiléticos ambulatoriais. *J Bras Psiquiatr*, 47(6):285-9, 1998.
- BRUNO V. et al. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab*. 21:1013-33, 2001.
- BRUNS J.JR, HAUSER WA The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia*, 44:2-10. 2003.
- CAPURON L. AND MILLER, A.H. "Cytokines and psychopathology: lessons from interferon- α ," *Biological Psychiatry*, vol. 56, no. 11, pp. 819–824, 2004.
- CARVER CS, CONNOR-SMITH J. Personality and coping. *Annu Rev Psychol*, 61: 679-704, 2010.
- CHEN JK. et al. Neural substrates of symptoms of depression following concussion in male athletes with persisting postconcussion symptoms. *Arch Gen Psychiatry*, 65(1):81-9, 2008.
- CHEN, X. R. et al. Neurological recovery-promoting, antiinflammatory, and anti-oxidative effects afforded by fenofibrate, a PPAR alpha agonist, in traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 24(7):1119–1131, 2007.
- CLARK RS. et al. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J Neurotrauma*. 11(5):499–506, 1994.
- CORONADO VG. et al. Surveillance for traumatic brain injury-related deaths--United States, 1997-2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Surveillance Summaries*, Washington, D.C. 60:1–32, 2011.
- CRESPO AR. et al. Increased serum sFas and TNFalpha following isolated severe head injury in males. *Brain Inj*. 21(4):441-7, 2007.

CSUKA E, MORGANTI-KOSSMANN MC, LENZLINGER PM, et al. IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and bloodbrain barrier function. *J Neuroimmunol.* 101(2):211–221, 1999.

CSUKA E. et al. Cell activation and inflammatory response following traumatic axonal injury in the rat. *Neuroreport.* 11(11):2587–2590, 2000.

CZEITER E. et al. Brain injury biomarkers may improve the predictive power of the IMPACT outcome calculator. *Journal of Neurotrauma*, 29(9): 1770–1778, 2012.

DAITO K, SUOU T, KAWASAKI H. Serum and urinary neopterin levels in patients with chronic active hepatitis B treated with interferon. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 83: 303–16, 1994.

DAMASIO H. et al. The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science*, 264(5162):1102–1105, 1994.

DIAZ AP et al. Psychiatric disorders and health-related quality of life after severe traumatic brain injury: a prospective study. *J Neurotrauma*, 29(6):1029–1037, 2012.

DIKMEN SS. et al. Natural history of depression in traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 85(9):1457–64, 2004.

DRINGEN R, GUTTERER JM, HIRRLINGER J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267 (16): 4912–4916, 2000.

DUFFAU, H. The "frontal syndrome" revisited: lessons from electrostimulation mapping studies. *Cortex*, 48(1):120–31, 2012.

DZIURDZIK P, KRAWCZYK L, JALOWIECKI P, KONDERA-ANASZ Z, MENON L Serum interleukin-10 in ICU patients with severe acute central nervous system injuries *Inflammation Research.* 53: 338–343, 2004.

EDITORIAL Neopterin in Clinical Medicine, *Lancet* i:509–511, 1988.

ELKABES S, DICICCO-BLOOM EM, BLACK IB. Brain microglia / macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci.* 16(8):2508–2521, 1996.

- FABER-ELMAN A. et al. Vitronectin overrides a negative effect of TNF-alpha on astrocyte migration. *Faseb J.* 9(15):1605–1613, 1995.
- FAN L. et al. Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 36(2):287–291, 1996.
- FARIDHOSSEINI F. et al. Celecoxib: a new augmentation strategy for depressive mood episodes. A systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Hum Psychopharmacol.* 29(3):216-23, 2014.
- FEDOROFF JP. et al. Depression in patients with acute traumatic brain injury. *Am J Psychiatry*, 149(7):918-23, 1992.
- FEIGIN, V. L. et al. Incidence of traumatic brain injury in New Zealand: a population-based study. *Lancet Neurol* 12(1): 53-64, 2013.
- FENNIG S. et al. Best-estimate versus structured interview-based diagnosis in first-admission psychosis. *Compr Psychiatry*, 35(5):341-8, 1994.
- FINFER SR, COHEN J. Severe traumatic brain injury. Resuscitation. 48(1):77-90, 2001.
- FIRST MB. et al. Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Clinician Version (SCID-CV). In: (Ed.). *Biometrics Research*. New York: New York State Psychiatric Institute, 1996.
- FOURNIER JC. et al. Antidepressant drug effects and depression severity: a patient-level metaanalysis. *JAMA*, 303(1):47-53, 2010.
- FUCHS D, HAUSEN A, KOFLER M, KOSANOWSKI H, REIBNEGGER G, WACHTER H. Neopterin as an index of immune response in patients with tuberculosis. *Lung* 162: 337–46, 1984.
- FUCHS D, HAUSEN A, REIBNEGGER G, WERNER ER. Neopterin as a marker for activated cell mediated immunity: application in HIV Infection. *Immunol. Today*, 9: 150-155, 1988.
- FURBRINGER E SILVA SC, DE SOUSA RM. Galveston Orientation and Amnesia Test: applicability and relation with the Glasgow Coma Scale. *Rev Lat Am Enfermagem* 15(4):6517, 2007.
- GEHRMANN J, MATSUMOTO Y, KREUTZBERG GW. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 20(3):269–287, 1995.

GENNARELLI, T. A. Mechanisms of brain injury. *The Journal of Emergency Medicine*, 11(1):5–11, 1993.

GIULIAN, D. et al. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 9(12):4416–4429, 1989.

GODEFROY O. et al. Dysexecutive syndrome: diagnostic criteria and validation study. *Ann Neurol*, 68(6): 855-864, 2010.

GOMEZ-HERNANDEZ R. et al. Social impairment and depression after traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 78(12):1321-6, 1997.

GOPCEVIC A. et al. Plasma interleukin-8 as a potential predictor of mortality in adult patients with severe traumatic brain injury. *Tokohu J Exp Med*. 211(4):387-93, 2007.

GORENSTEIN C, ANDRADE L. Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects. *Braz J Med Biol Res*, 29(4):453-7, 1996.

GOULD KR. et al. The nature, frequency and course of psychiatric disorders in the first year after traumatic brain injury: a prospective study. *Psychol Med*, 41(10):2099-2109, 2011.

GRIESBACH GS, HOVDA DA, GOMEZ-PINILLA F, SUTTON RL. Voluntary exercise or amphetamine treatment, but not the combination, increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and synapsin I following cortical contusion injury in rats. *Neuroscience*. 154(2):530-40, 2008.

GRIFFIN PT, KOGUT D. Validity of orally administered Beck and Zung Depression Scales in a state hospital setting. *J Clin Psychol*, 44(5):756-9, 1988.

GULLO et al. Hospital Mortality of Patients with Severe Traumatic Brain Injury is Associated with serum PTX3 Levels. *Neurocrit. Care* 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. ed. New York: Oxford University Press, USA, 2007.

HAMILTON MA. Rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 23:56-62, 1960.

- HOFFMAN G. et al. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. *Inflamm. Res.* 52(8): 313-321, 2003.
- HOLMIN S, SODERLUND J, BIBERFELD P, MATHIESEN T. Intracerebral inflammation after human brain contusion. *Neurosurgery.* 42(2):291-298, 1998.
- HOLSINGER T. et al. Head injury in early adulthood and the lifetime risk of depression. *Arch Gen Psychiatry*, 59(1):17-22, 2002.
- HUANG EJ, REICHARDT LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience* 24: 677-736, 2001.
- HUBER C. et al. Immune response Associated Production of Neopterin: Release from Macrophages Primarily under Control of Interferon Gamma. *J. Exp. Med.* 160:310-316, 1984.
- HUGHES, T.K. et al. Evidence for the production and action of interleukin-10 in pituitary cells," *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 14, no. 1, pp. 59-69, 1994.
- IRWIN, MR MILLER, A.H. Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(4):374-383, 2007.
- JENNA M. ZIEBELL AND MARIA CRISTINA MORGANTI-KOSSMANN Involvement of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines and Chemokines in the Pathophysiology of Traumatic Brain Injury *Neurotherapeutics* 7:22-30, 2010.
- JENNETT B. et al. Predicting outcome in individual patients after severe head injury. *Lancet*, 1(7968):1031-1034, 1976.
- JORGE RE. et al. Major depression following traumatic brain injury. *Arch Gen Psychiatry*, 61(1): 42-50, 2004.
- KASKI JC. Neopterin - A Forgotten Biomarker. *JACC* 42(6):1140-1146, 2003.

KESSLER RC. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, 62(6): 593-602, 2005.

KIM, K. S. et al. Modulation of blood-brain barrier permeability by tumor necrosis factor and antibody to tumor necrosis factor in the rat. *Lymphokine and Cytokine Research*, 11(6):293–298,1992.

KITA T, LIU L, TANAKA N, KINOSHITA Y. The expression of tumor necrosis factor-alpha in the rat brain after fluid percussive injury. *Int J Legal Med*. 110(6):305–311, 1997.

KNOBLACH SM, FADEN AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 153(1):143–151, 1998.

KUSHNER I, BRODER ML, KARP D. Control of the acute phase response:Serum C-reactive protein kinetics after acute myocardial infarction. *J. Clin. Invest*. 61:235-242, 1978.

LAPLACA MC, SIMON CM, PRADO, GR, CULLEN, DK. CNS injury biomechanics and experimental models *Prog Brain Res*. 1326, 2007.

LECKMAN JF. et al. Best estimate of lifetime psychiatric diagnosis: a methodological study. *Arch Gen Psychiatry*, 39 (8):879-83, 1982.

LEDOCHOWSKI M, MURR C, JÄGER M, FUCHS D. Dehydroepiandrosterone, ageing and immune activation. *Exp. gerontol*. 36:1739-1747, 2001.

LEDOCHOWSKI M, MURR C, WINDER B, FUCHS D. Inverse Relationship between Neopterin and Immunoglobulin E. *Clinical Immunol*. 98(1):104-108, 2001.

LEENTJENS AF. et al. The validity of the Hamilton and Montgomery-Asberg depression rating scales as screening and diagnostic tools for depression in Parkinson's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, v. 15, n. 7, p. 644-9, 2000.

LEIBROCK J. et al. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341: 149– 152, 1989.

LIBERTO CM. et al. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem*. 89(5):1092–1100, 2004.

LIPTON SA, ROSENBERG PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* 330:613-22, 1994.

LU B Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron* 39: 735–738, 2003.

LUCAS S, ROTHWELL NJ, GIBSON RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 147(S1):232–240, 2006.

LUCASSEN, P.J. et al. Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *European Journal of Neuroscience*, 14(1):161–166, 2001.

LYKETSOS CG, ROSENBLATT A, RABINS P. Forgotten frontal lobe syndrome or "Executive Dysfunction Syndrome". *Psychosomatics*, 45(3):247-255, 2004.

MAAS AI, STOCCHETTI N, BULLOCK R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol*, 7(8): 728-41, 2008.

MAES, M. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis, *Progress in Neuropsychopharmacol and Biological Psychiatry*, vol. 19, pp. 11–38, 1995.

MAIER B. et al. Physiological levels of pro- and anti-inflammatory mediators in cerebrospinal fluid and plasma: a normative study. *J Neurotrauma.* 22(7):822–835, 2005.

MAIER B. et al. Physiological levels of pro- and anti-inflammatory mediators in cerebrospinal fluid and plasma: a normative study. *J Neurotrauma.* 22(7):822–835, 2005.

MARION DW. Lactate and traumatic brain injury. *Crit Care Med.* 27(9):2063–2064,1999.

MARSHALL LF, MARSHALL SB, KLAUBER MR. A new classification of head injury based on computerized tomography. *Journal of Neurosurgery*,75:S14–20, 1991.

MARTINS ET. et al. "Mortality in severe traumatic brain injury: a multivariate analysis of 748 Brazilian patients from Florianopolis City." *J Trauma* 67(1): 8590, 2009.

- MASINI, M. "Epidemiological study of head injuries in the Federal District of Brazil." *J Bras Neurocirurg* 5: 61-8, 1994.
- MASTERS SJ, MCCLEAN PM, ARCARESE JS. Skull x-ray examinations after head trauma. Recommendations by a multidisciplinary panel and validation study. *N Engl J Med*. 316(2):84-91, 1987.
- MCALLISTER AK, LO DC, KATZ LC. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15: 791-803, 1995.
- MCCLEARY C. et al. Depression after traumatic brain injury as a function of Glasgow Outcome Score. *J Clin Exp Neuropsychol* 20(2):270-9, 1998.
- MENDELOW AD, TEASDALE G, JENNET B, BRYDEN J, HESSETT C, MURRAY G: Risks of intracranial haematoma in head injured adults. *Br Med J*. 287:1173-6, 1983.
- MESQUITA, A.R. et al., IL- 10 modulates depressive-like behavior. *Journal of Psychiatric Research*, 43(2): 89-97, 2008
- MOLINA-HOLGADO, E. LPS/IFN- γ cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10," *European Journal of Neuroscience*, vol. 13, no. 3, pp. 493-502, 2001.
- MOORE, K.W et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, vol. 19, pp. 683-765, 2001.
- MORENO RA, MORENO DH. Escalas de depressão de Montgomery e Asberg (MADRS) e de Hamilton (HAM-D). *Rev Psiquiatr Clin*, 25(5):262-72, 1998.
- MORGANTI-KOSSMANN MC, RANCAN M, STAHEL PF, KOSSMANN T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*. 8(2):101-105, 2002.
- MORGANTI-KOSSMANN MC. et al. TGFbeta is elevated in the CSF of patients with severe traumatic brain injuries and parallels blood-brain barrier function. *J Neurotrauma*. 16(7):617-628, 1999.
- MORGANTI-KOSSMANN, M. C.; KOSSMANN, T.; WAHL, S. M. Cytokines and neuropathology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13(7):286-291, 1992.

MUSSACK T. et al.. Serum S-100B and interleukin-8 as predictive markers for comparative neurologic outcome analysis of patients after cardiac arrest and severe traumatic brain injury. *Crit Care Med.* 30(12):2669-74, 2002.

NAKAJIMA K, KOHSAKA S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 4(1):65–84, 2004.

NAKASE-RICHARDSON R. et al. Utility of post-traumatic amnesia in predicting 1-year productivity following traumatic brain injury: comparison of the Russell and Mississippi PTA classification intervals. *J Neurology Neurosurg Psychiatry*, 82(5):494-9, 2011.

NATHOO N, CHETRY R, VAN DELLEN JR, CONNOLLY C, NAIDOO R. Apolipoprotein E polymorphism and outcome after closed traumatic brain injury: influence of ethnic and regional differences. *J Neurosurg.* 98:302-6, 2003.

NIMJEE, S. M. et al. Blood-Brain Barrier. In: Youmans: Neurological Surgery. 6. ed. Philadelphia: Elsevier. 1:14761, 2011

NOLAN S. "Traumatic brain injury: a review." *Crit Care Nurs Q* 28(2): 188-94, 2005.

NORTH, S. H. et al. Rapid analytical methods for on-site triage for traumatic brain injury. *Annual Review of Analytical Chemistry*, Palo Alto, v. 5, p. 35–56, 2012.

O'DRISCOLL K, LEACH JP. "No longer Gage": an iron bar through the head. Early observations of personality change after injury to the prefrontal cortex. *BMJ* 317(7174): 1673-4, 1998.

PAHAN, K., KHAN, M. and SINGH, I. Interleukin-10 and interleukin-13 inhibit proinflammatory cytokine-induced ceramide production through the activation of phosphatidylinositol 3- kinase. *Journal of Neurochemistry*, 75(2):576–582, 2000.

PANICHI V. et al. The link of biocompatibility to cytokine production *Kidney International*, 58(76):96–103, 2000.

PARDRIDGE, W. M. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Molecular Biotechnology*, 30 (1):57–69, 2005

PEEK-ASA C. et al. "Early predictors of mortality in penetrating compared with closed brain injury." *Brain Inj* 15(9): 801-10, 2001.

PELEGRIN-VALERO CA. et al. [Nosologic aspects of personality change due to head trauma]. *Rev Neurol*, 32(7):681-7, 2001.

PEPYS MB1, HIRSCHFIELD GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*.111(12):1805-1812, 2003.

POBER JS, COTRAN RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev*. 70(2):427–451, 1990.

PONSFORD J. et al. Functional outcome 10 years after traumatic brain injury: its relationship with demographic, injury severity, and cognitive and emotional status. *J Int Neuropsychol Soc* 14(2): 233-42, 2008.

PRIGATANO, G.P. Personality disturbances associated with traumatic brain injury." *J Consult Clin Psychol* 60(3): 360-8, 1992.

RAIS, C.L. et al. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression, *Trends in Immunology*, 27(1):24–31, 2006.

RAISON C. L. and MILLER A.H., “When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *American Journal of Psychiatry*, 160(9):1554–1565, 2003.

RAIVICH G. et al. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*. 30(1):77–105, 1999.

RAMLACKHANSINGH AF et al Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol*. 70(3):374-83, 2011.

RAO V. et al. Clinical correlates of personality changes associated with traumatic brain injury. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 20(1):118-119, 2008.

RAPOPORT MJ. et al. Cognitive impairment associated with major depression following mild and moderate traumatic brain injury. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 17(1): 61-6, 2005.

RAPOPORT, M. J. et al. Cognitive impairment associated with major depression following mild and moderate traumatic brain injury. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 17(1): 61-5, 2005.

ROOZENBEEK B, MASS AIR, MENON DK. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurol*. 9:231–236 2013.

- ROSENBERG GA, ESTRADA EY, DENCOFF JE, STETLERSTEVENSON WG. Tumor necrosis factor- α -induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain Res.* 703(1-2):151-155, 1995.
- ROSENFELD JV, et al. Blast-related traumatic brain injury. *Lancet Neurol*, (12)9:882-93, 2013.
- ROSTWOROWSKI M. et al. Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon- γ . *J Neurosci.* 17(10):3664-3674, 1997.
- SAATMAN KE. et al. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *Journal of Neurotrauma*, 25(7):719-738, jul. 2008.
- SAHA RN, LIU X, PAHAN K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF- α : a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol.* 1(3):212-222.) 2006.
- SAHUQUILLO J, POCA MA, AMOROS S. Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Current Pharmaceutical Design*, 7(15):1475-1503, 2001.
- SANTIAGO LA. et al. A clinical comparison of penetrating and blunt traumatic brain injuries. *Brain Inj*, 26(2):107-125, 2012.
- SCHWARZBOLD M. et al. "Psychiatric disorders and traumatic brain injury." *Neuropsychiatr Dis Treat* 4: 797-816, 2008.
- SEEL RT, MACCIOCCHI S, KREUTZER JS. Clinical considerations for the diagnosis of major depression after moderate to severe TBI. *J Head Trauma Rehabil*, 25 (2): 99-112, 2010.
- SEEL RT. et al. Depression after traumatic brain injury: a National Institute on Disability and Rehabilitation Research Model Systems multicenter investigation. *Archives Phys Med Rehabil*, 84(2): 177-84, 2003.
- SHIMONKEVITZ R. et al. Transient monocyte release of interleukin-10 in response to traumatic brain injury. *Shock.* 12(1):10-16, 1999.
- SHIOZAKI T. et al. Cerebrospinal fluid concentrations of anti-inflammatory mediators in early-phase severe traumatic brain injury. *Shock.* 23(5):406-410, 2005.

SHOHAMI E, GINIS I, HALLENBECK JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10(2):119–130, 1999.

SMARR KL, KEEFER AL. Measures of depression and depressive symptoms: Beck Depression Inventory-II (BDI-II), Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D), Geriatric Depression Scale (GDS), Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS), and Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9). *Arthritis Care Research*, 63 (11): S454-466, 2011.

SMITH, R.S. The macrophage theory of depression. *Medical Hypotheses*, 5: 298–306, 1991.

SMITH,E.M et al. IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain,” *Journal of Neuroimmunology*, vol. 100, no. 1-2, pp. 140–148, 1999.

SNAITH RP. The Hospital Anxiety And Depression Scale. *Health Qual Life Outcomes*, 1:29, 2003.

SOARES, FMS et al. Interleukin-10 Is an Independent Biomarker of Severe Traumatic Brain Injury Prognosis, *NeuroImmunoModulation*, 19:377-385, 2012.

SPITZER RL. et al. The Structured Clinical Interview for DSM-III-R (SCID). I: History, rationale, and description. *Arch Gen Psychiatry*, 49(8): 624-9, 1992.

SPITZER RL. Psychiatric diagnosis: are clinicians still necessary? *Compr Psychiatry*, 24(5): 399-411, 1983.

STAHEL PF. et al. Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20(2):369–380, 2000.

STEFANO, G.B. et al. Interleukin-10 stimulation of corticotrophin releasing factor median eminence in rats: evidence for dependence upon nitric oxide production,” *Neuroscience Letters*, 256(3):167–170, 1998.

STEYERBERG EW. et al. Predicting outcome after traumatic brain injury: development and international validation of prognostic scores based on admission characteristics. *PLoS Medicine*, 5(8): e165; discussion e165, 2008.

- STRLE, K. et al., IL-10 promotes survival of microglia without activating Akt. *Journal of Neuroimmunology*, 122(1-2): 9–19, 2002.
- STROHMAIER W, REDL H, SCHLAG G, INTHORN D. D-erythro-neopterin plasma levels in intensive care patients with and without septic complications. *Crit Care Med* 15: 757–60, 1987.
- SU, S.H. et al. Elevated C-reactive protein levels may be a predictor of persistent unfavourable symptoms in patients with mild traumatic brain injury: a preliminary study. *Brain Behav Immun*. 38:111-117, 2014.
- TALLEY, A. K. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA. *Molecular and Cellular Biology*, 15(5): 2359–2366, 1995.
- TAUPIN V. et al. Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J Neuroimmunol*. 42(2):177–185, 1993.
- TAVARES M. Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV: Transtornos do Eixo I Edição para Pacientes (SCID-I/P 2.0). Brasília: Instituto de Psicologia, Universidade de Brasília, 1996.
- TCHELINGERIAN JL. et al. Differential oligodendroglial expression of the tumor necrosis factor receptors in vivo and in vitro. *J Neurochem*. 65(5):2377–2380, 1995.
- TEASDALE G, MATHEW P. Mechanisms of cerebral concussion, contusion and other effects of head injury. In: Youmans JR, editor. 4th ed., Philadelphia, WB Saunders; p.1533-1548, 1996.
- THAIS ME et al. Plasma levels of oxidative stress biomarkers and long-term cognitive performance after severe head injury. *CNS Neurosci Ther*. 18(7):606-8, 2012.
- TILLET WS, FRANCIS T JR. Serological reactions in pneumonia with non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med*. 52: 561-71, 1930.
- TURNBULL, A.V. and RIVIER, C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiological Reviews*, 79(1):1–71, 1999.

VALKO M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1):44–84, 2007.

VAN REEKUM, R.; COHEN, T.; WONG, J. Can traumatic brain injury cause psychiatric disorders? *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, v. 12, n. 3, p. 316-27, 2000.

WHELAN-GOODINSON R, PONSFORD J, SCHONBERGER M. Association between psychiatric state and outcome following traumatic brain injury. *J Rehabil Med*, 40(10):850-7, 2008.

WHELAN-GOODINSON R. et al. Psychiatric disorders following traumatic brain injury: their nature and frequency. *J Head Trauma Rehabil*, 24(5):324-32, 2009.

WILSON J.X., GELB A.W. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. *J Neurosurg Anesthesiol* 14:66-79, 2002.

WILSON JT, PETTIGREW LE, TEASDALE GM. Structured interviews for the Glasgow Outcome Scale and the extended Glasgow Outcome Scale: guidelines for their use. *Journal of Neurotrauma*, 15(8):573–585, 1998.

WRONA, D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *Journal of Neuroimmunology*, 172:38–58, 2006.

ZIGMOND AS, SNAITH RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand*, 67(6):361-70, 1983.

ZIMMERMAN M. et al. Severity classification on the Hamilton Depression Rating Scale. *J Affect Disord*, 150(2):384-8, 2013.

8 APÊNDICES

8.1. LETTER SUBMETIDA

HIGHER LEVELS OF PLASMA INTERLEUKINE 10 ARE ASSOCIATED WITH MAJOR DEPRESSION AFTER SEVERE TRAUMATIC BRAIN INJURY

Journal: CNS Neuroscience & Therapeutics

Manuscript ID: CNSNT-2014-436 R1

Manuscript Type: Letter to the Editor

Date Submitted by the Author: 22-Nov-2014

Flávia Mahatma Schneider Soares,¹ Marcelo Liborio Schwarzbold,¹ Alexandre Paim Diaz,¹ Marcelo Neves Linhares,^{1,2} Ricardo Guarnieri,¹ João Luciano de Quevedo,^{3,4} Felipe Dal Pizzol,⁶ Kátia Lin,^{1,5} Roger Walz^{1,5}

1. Centro de Neurociências Aplicadas (CeNap), Hospital Universitário (HU), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil
2. Serviço de Neurocirurgia, Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, SC, Brazil
3. Laboratório de Neurociências, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.
4. Center for Experimental Models in Psychiatry, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX, USA.
5. Departamento de Clínica Médica, HU, USFC.
6. Laboratorio de Patofisiologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC, Brazil.

Depression is the most common psychiatric syndrome following traumatic brain injury (TBI), but its specific biological mechanisms are poorly understood. Cytokine-mediated immune activation is associated with the onset of depressive symptoms, as evidenced by clinical and experimental data [1]. Clinical and experimental studies also shown that severe TBI is accompanied by chronic brain inflammation, manifested by microglial activation persisting many years after injury [2, 3]. So far few

studies have assessed the role of chronic inflammation in depression following TBI. In this context, the present study aimed to compare the serum inflammatory profile of patients with and without depression in the chronic fase of severe TBI.

Data was prospectively collected as described in Figure 1. Subjects consecutively admitted due to severe TBI in a Level I Trauma Center in the metropolitan area of Florianópolis (southern Brazil) were assessed as outpatients in the chronic phase of TBI. Severe TBI was defined by a Glasgow Coma Scale score of 8 or lower on admission; patients living outside the scope area, victims of gunshot injury and those youger than 16 years old were not included. Psychiatric assessment was performed by two experienced psychiatrists who were blinded to hospitalization and inflammatoy variables. Diagnoses were made through direct interview with patients and relatives using the brazilian version of the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I). Personality change due to TBI (mostly apathy, dishinibition, agression and affective lability) was defined using the DSM-IV-TR criteria. After the psychiatric evaluation, blood samples were collected for differential leukogram analysis and blood excess was processed and stored at -80°C until assayed. Cytokines levels were determined by flow cytometry using the BD TM CBA Human Th1/Th2 Cytokine kit (BD Biosciences, San Diego, California, USA). C-reactive protein was measured using the Immulite 2000[®] Immunoassay System (Siemens). The researcher who performed immunologic analysis was blinded for all clinical and psychiatric data. The study was approved by our Ethics Committee, and written informed consent was obtained from the patients and relatives.

The dependent dichotomous variable “depression” comprises patients with or without a current major depressive episode of major depressive disorder (that is, only patients fulfilling criteria of a depressive episode at the time of assessment were comprised the depression group). Independent variables consisted in a range of demographic, clinical, psychatric, and inflammatory data. Categorical data was analysed by logistic regression and expressed as odds ratios with a 95% confidence interval. Continuous variables were first analysed by the Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit test and the Levene test to define normality and homoscedasticity, respectively. A comparison using a *t* test with or without Welch’s correction or a Mann-Whitney U test was then performed. A level of significance of *p* less than 0.05 was set.

As showed in table 1, patients with and without depression did not differ in demographic, clinical, and psychiatric parameters. However, patients with depression had higher levels of serum interleukin-10 (IL-10) compared to patients without depression ($p = 0.03$), as well as lower tumor necrosis factor- α /IL-10 ratios. Studies have found that increased levels of IL-10 are related to a poor prognosis in the acute phase of TBI [4, 5]. This association may be of mechanistic importance rather than an epiphenomenon, as suggested by experimental data [6]. More recently, it was demonstrated that acute and subacute proinflammatory states were associated with negative outcomes in later phases of TBI [7].

To our knowledge, this is the first study to investigate the relationship of chronic serum cytokine levels and depression in severe TBI patients. The increased IL-10 levels and decreased TNF- α /IL-10 in patients with depression indicate an anti-inflammatory state which at first sight seem to be the opposite of what one would expect according to the inflammatory hypothesis of depression. However, one can speculate this represent an endogenous compensation to the chronic inflammation of the brain which in turn is related to depression, or even the remaining response to inflammation in the acute phase of TBI. Researchers have previously suggested a similar hypothesis to explain increased IL-10 levels in other inflammatory diseases [8]. In addition, inflammatory dysregulation in depression seem to be a complex and heterogenous phenomenon, as exemplified by different immune patterns in melancholic and non melancholic depression [9].

Future clinical studies with larger samples measuring inflammatory markers longitudinally and analysing their relationship with symptomatic dimensions of depression, as well as experimental studies performing mechanistic interventions may help to elucidate the role of inflammation in depression after TBI.

Acknowledgments: This work was supported by CPNq (Brazilian Council for Scientific and Technologic Development, Brazil), FAPESC (Foundation for Scientific Research and Technology of the State of Santa Catarina) and CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel).

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

1. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):46-56.
2. Nagamoto-Combs K, McNeal DW, Morecraft RJ, Combs CK. Prolonged microgliosis in the rhesus monkey central nervous system after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2007 Nov;24(11):1719-42.
3. Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM, et al. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Sep;70(3):374-83.
4. Bell MJ, Kochanek PM, Doughty LA, Carcillo JA, Adelson PD, Clark RS, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma*. 1997 Jul;14(7):451-7.
5. Soares FS, Souza NM, Schwarzbald ML, Diaz AP, Nunes JC, Hohl A, et al. Interleukin-10 is an independent biomarker of severe traumatic brain injury prognosis. *Neuroimmunomodulation*. 2012;Submitted.
6. Kline AE, Bolinger BD, Kochanek PM, Carlos TM, Yan HQ, Jenkins LW, et al. Acute systemic administration of interleukin-10 suppresses the beneficial effects of moderate hypothermia following traumatic brain injury in rats. *Brain Res*. 2002 May 24;937(1-2):22-31.
7. Kumar RG, Boles JA, Wagner AK. Chronic Inflammation After Severe Traumatic Brain Injury: Characterization and Associations With Outcome at 6 and 12 Months Postinjury. *J Head Trauma Rehabil*. 2014 Jun 4.
8. Oltmanns U, Schmidt B, Hoernig S, Witt C, John M. Increased spontaneous interleukin-10 release from alveolar macrophages in active pulmonary sarcoidosis. *Exp Lung Res*. 2003 Jul;29(5):315-28.
9. Rothmundt M, Arolt V, Fenker J, Gutbrodt H, Peters M, Kirchner H. Different immune patterns in melancholic and non-melancholic major depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2001;251(2):90-7.

Table 1: Clinical, demographic, radiologic, psychiatric and immunologic variables according to the occurrence of major depression after the severe TBI

VARIABLES	All patients <i>n</i> = 37 (%)	Depression after TBI		Odds ratio value (95% CI)	<i>P</i> value
		Yes <i>n</i> = 11 (29.7)	No <i>n</i> = 26 (70.3)		
DEMOGRAPHIC AND CLINICAL					
Gender					
Female	8 (21.6)	2 (25.0)	6 (75.0)	1.00	
Male	29 (78.4)	9 (31.0)	20 (69.0)	1.35 (0.23 – 8.03)	0.74
Age at injury, mean (± SE)	30.5 (± 2.0)	31.9 (± 2.6)	29.9 (± 2.6)	NA	0.64
Years of education, mean (± SE)	10.1 (± 0.8)	9.6 (± 1.3)	10.3 (± 1.0)	NA	0.67
Marshal CT classification ^a					
I-II	8 (24.0)	4 (40.0)	4 (17.4)	1.0	
III-IV	8 (24.0)	3 (30.0)	5 (21.7)	0.6 (0.8 – 4.4)	0.61
V-VI	17 (52.0)	2 (30.0)	14 (60.9)	0.21 (0.03 – 1.4)	0.10
GCS at admission ^b					
3 – 4	11 (40.0)	2 (18.2)	9 (81.8)	1.00	
5 – 6	10 (28.6)	2 (20.0)	8 (80.0)	3.38 (0.52 – 21.73)	0.20
7 – 8	14 (31.4)	6 (49.9)	8 (51.1)	1.13 (0.13 – 9.94)	0.92
Pupils at admission ^c					
Isocoric	26 (76,5)	17 (70.8)	9 (90.0)	1.0	
Anisocoric	8 (23,5)	7 (29.2)	1 (10.0)	0.27 (0.29 – 2.54)	0.27

VARIABLES	All patients <i>n</i> = 37 (%)	Depression after TBI		Odds ratio value (95% CI)	<i>P</i> value
		Yes <i>n</i> = 11 (29.7)	No <i>n</i> = 26 (70.3)		
Chronic disease^d					
Yes	7 (18.9)	3 (42.9)	4 (57.1)	1.00	
No	30 (81.1)	8 (26.7)	22 (73.3)	2.06 (0.38 – 11.31)	0.40
Months after TBI, mean (± SE)	17.5 (1.0)	18.6 (2.0)	17.1 (1.1)	NA	0.46
PSYCHIATRIC					
Substance abuse or dependence					
Yes	10 (27.0)	2 (20.0)	8 (80.0)	1.00	
No	27 (73.0)	9 (33.3)	18 (66.7)	2.00 (0.35 – 11.44)	0.44
Personality changes					
Yes	9 (24.3)	3 (33.3)	6 (66.7)	1.00	
No	28 (75.7)	8 (28.6)	20 (71.4)	1.25 (0.25 – 6.26)	0.79
Use of antidepressants					
Yes	3 (8.1)	2 (66.7)	1 (33.3)	1.00	
No	34 (91.9)	9 (26.5)	25 (73.5)	5.56 (0.45 – 68.94)	0.18
INFLAMMATORY					
CRP, median (IQ) mg/l	1.57 (0.53 – 6.28)	1.20 (0.55 – 3.33)	2.16 (0.46 – 6.80)	NA	0.67
IFγ, median (IQ) x 10³ pg/ml	5.45 (1.24 –	5.90 (0.25 –	5.30 (2.56 –	NA	0.74

VARIABLES	All patients <i>n</i> = 37 (%)	Depression after TBI		Odds ratio value (95% CI)	<i>P</i> value
		Yes <i>n</i> = 11 (29.7)	No <i>n</i> = 26 (70.3)		
	71.30)	276.65)	79.50)		
IL-2 , median (IQ) x 10 ³ pg/ml	0.60 (0.00 – 5.00)	0.48 (0.05 – 1.03)	0.80 (0.00 – 6.15)	NA	0.58
IL-4 , median (IQ) x 10 ³ pg/ml	0.60 (0.30 – 4.30)	0.52 (0.00 – 3.25)	0.60 (0.32 – 5.65)	NA	0.42
IL-5 , median (IQ) x 10 ³ pg/ml	0.30 (0.03 – 1.60)	0.22 (0.00 – 1.45)	0.37 (0.09 – 1.60)	NA	0.42
IL-10 , median (IQ) x 10 ³ pg/ml	0.13 (0.01 – 0.95)	0.90 (0.08 – 1.07)	0.07 (0.01 – 0.78)	NA	0.03
TNFα , mean (± SE) 10 ³ pg/ml	1.15 (± 0.17)	1.04 (± 0.26)	1.19 (± 0.21)	NA	0.68
TNFα / IL-10 rate , median (IQ)	3.79 (1.36 – 27.04)	1.41 (0.60 – 3.26)	8.46 (2.06 – 42.67)	NA	0.01
Leukocytes , (x10 ³ /mm ³) mean (± SE)	6.55 (± 0.31)	6.30 (± 0.52)	6.67 (± 0.39)	NA	0.59
Neutrophils (%), mean (± SE)	55.55 (± 1.56)	54.16 (± 2.84)	56.18 (± 1.89)	NA	0.56
Lymphocytes (%), mean (± SE)	32.12 (± 1.67)	33.97 (± 2.80)	31.28 (± 2.08)	NA	0.46
Monocytes (%), mean (± SE)	7.71 (± 0.55)	8.40 (± 0.78)	7.42 (± 0.71)	NA	0.42
Eosinophils (%), mean (± SE)	3.15 (± 0.42)	2.92 (± 0.86)	3.26 (± 0.48)	NA	0.71
Basophil (%), median (IQ)	0.36 (0.14 – 0.80)	0.60 (0.36 – 0.71)	0.21 (0.10 – 0.95)	NA	0.32

Acknowledgments: This work was supported by CPNq (Brazilian Council for Scientific and Technologic Development, Brazil), FAPESC (Foundation for Scientific Research and Technology of the State of Santa Catarina) and CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel).

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

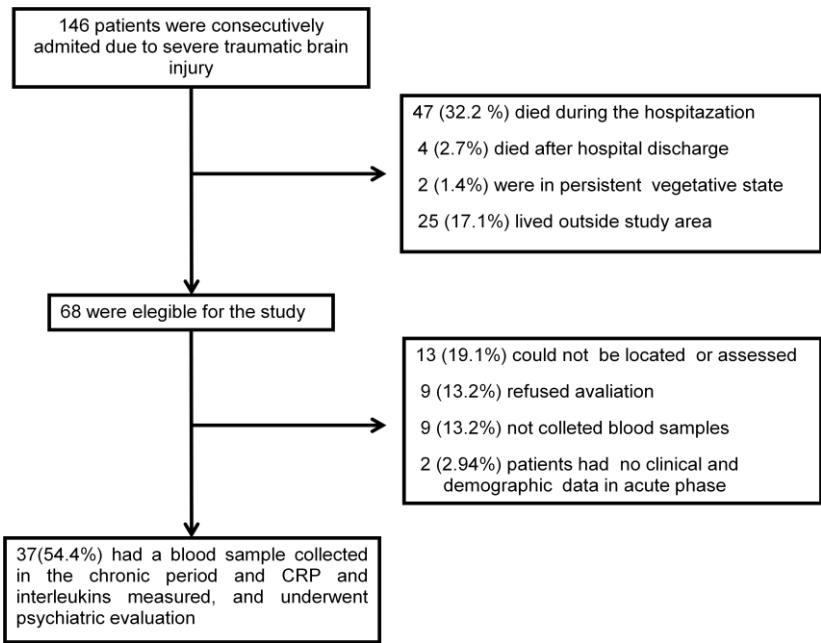


Figure 1: Sampling course for the psychiatric evaluation and blood sample collection

8.2. LETTER SUBMETIDA

Plasma levels of neopterin does not changes in earlier phases of TBI

Journal: Journal of Neurotrauma

Manuscript ID: NEU-2014-3779

Manuscript Type: Letter to the Editor

Date Submitted by the Author: 15-Dec-2014

Complete List of Authors: Flávia Mahatma Schneider Soares¹, Karina Ghisoni², Marcelo Liborio Schwartzbold¹, Alexandre Paim Diaz¹, Daniel Sousa Santos¹, Alexandre Hohl¹, Felipe Dal Pizzol^{4,5}, Alexandra Susana Latini^{1,2}, Roger Walz^{1,4}.

1. Centro de Neurociências Aplicadas (CeNAp), Hospital Universitário

(HU), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis,

SC, Brazil

2. Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de

Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC,

Brazil

3. Serviço de Neurocirurgia, Hospital Governador Celso Ramos,

Florianópolis, SC, Brazil

4. Departamento de Clínica Médica, HU, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

5. Laboratório de Patofisiologia experimental, Programa de Pós-Graduação

em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina

(UNESC), Criciúma, Brazil.

Keywords: ADULT BRAIN INJURY, BIOMARKERS, INFLAMMATION

Traumatic brain injury (TBI) is a serious public healthcare burden and the leading worldwide cause of morbidity and mortality of young people.(Maas, Stocchetti et al. 2008; Martins, Linhares et al. 2009; Diaz, Schwarzbald et al. 2012) Clinical and experimental findings suggests that moderate to severe TBI leads to brain and systemic immune response (Maas, Stocchetti et al. 2008). The extent of brain damage is determined by severity of primary mechanical injury and the cosequences of secondary biomolecular injury cascades, which cause neuroinflammation and contribute to cerebral edema, enhanced intracranial pressure and delayed cellular damage (Maas, Stocchetti et al. 2008). TBI results in early hormonal and inflammatory responses that are initiated by release of diverse immune system mediators and polymorphonuclear leukocytes infiltration. These events trigger the upregulation of adhesion molecules, cellular infiltration and increased levels of growth factors, pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules, resulting in either cell death or regeneration.(Maas, Stocchetti et al. 2008; Gullo Jda, Bertotti et al. 2011; Schneider Soares, Menezes de Souza et al. 2012) The circulating molecules might be usefull as biomarkers for the disease severity and/or prognosis.(Gullo Jda, Bertotti et al. 2011; Schneider Soares, Menezes de Souza et al. 2012; Hohl, Ronsoni et al. 2014) We have previously demonstrated the enhancement of serum levels of the humoral component of the innate immune system, Pentraxin 3 (PTX3), was independently associated to hospital mortality of patients in the acute phase of severe TBI (Gullo Jda, Bertotti et al. 2011). Neopterin (NEO) belongs to a chemical group of compounds known as pteridines and it is worldwide used as a biomarker of immune system activation.(Lenzlinger, Hans et al. 2001; Sauerland, Hensler et al. 2003) A previous study shows that only modest changes of marginal statistical significance were detected for NEO plasma levels determined by ELISA and regardless of injury pattern (cranial or extra-cranial trauma).(Sauerland, Hensler et al. 2003) Using a radio-immuno assay Lenzlinger at al. showed that plasma

NEO start to increase 3 days and remain high at least until 21 days after the severe TBI. (Lenzlinger, Hans et al. 2001) Here we investigated association between TBI severity in adult patients and NEO plasma levels determined by high performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection (HPLC-FLD) method.(de Lucas, Caputo et al. 2014). We included 136 consecutive patients (119 male, 86%) with severe TBI (Glasgow Coma Scale, GCS score ≤ 8), mean (SE) age 34 (1.5) years, admitted in our hospital. There were 104 (77%) with isolated TBI. For comparisons we selected age and sex matched

patients with mild TBI (GCS = 13-15, n = 8) and moderate TBI (GCS = 9-12, n = 13) attended in the same period and healthy controls (n = 25). There were no gunshot injury victims. Demographic and clinical data were obtained prospectively, according to our research previous described protocol.(Martins, Linhares et al. 2009; Gullo Jda, Bertotti et al. 2011; Schneider Soares, Menezes de Souza et al. 2012; Hohl, Ronsoni et al. 2014) The study was approved by our Ethics Committee, and written informed consent was obtained from patients or their relatives (in more severe cases). A blood sample was collected from all the included patients in median 11 hours (IQ range 6–19) after the hospital admission (at the emergence room or intensive care unit). One additional sample was collected from patients with severe TBI in median 30 hours (IQ range 24–37 hours) after the hospital admission (at the intensive care unit). Five milliliters of peripheral venous blood were collected and centrifuged. The plasma was stored -80oC until the biochemical analyzes. NEO results were expressed in nmol/L and presented in the Figure 1. The plasma levels of NEO remain at normal ranges after the TBI in all the studied groups (see Figure 1A and B). Neopterin is produced by macrophages upon stimulation with gamma interferon (Huber, Batchelor et al. 1984), and concentration of neopterin is generally considered to reflect macrophage activation and blood-borne macrophages invading the CNS may account for intrathecal neopterin release. The lack of enhancement in the plasma Neo levels in earlier periods after the TBI may be related to experimental findings showing that entry of macrophages into the brain after TBI is maximal 24 to 72 h following the lateral fluid percussion in rats.(Lenzlinger, Hans et al. 2001)

Our findings using HPLC-FLD are in accordance to previous studies using ELISA (Sauerland, Hensler et al. 2003) and radio-immuno assay (Lenzlinger, Hans et al. 2001) techniques showing that plasma levels of neopterin measured up to 30 hours after the injury is not useful biomarker for hospital mortality in TBI. The association among plasma levels of neopterin measured in chronic periods after the TBI and the patient's prognosis, including the cognitive performance, psychiatric symptoms and quality of life deserve further investigation.

Acknowledgments: This work was supported by PRONEX Program (NENASC Project) and PPSUS Program of Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest

References:

1. Diaz, A.P., Schwarzbald, M.L., Thais, M.E., Hohl, A., Bertotti, M.M., Schmoeller, R., Nunes, J.C., Prediger, R.D., Linhares, M.N., Guarnieri, R., Walz, R. (2012). Psychiatric disorders and health-related quality of life after severe traumatic brain injury: a prospective study. *J. Neurotrauma* 29, 1029-37.
2. Maas, A.I., Stocchetti, N., Bullock, R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 7, 728-41.
3. Martins, E.T., Linhares, M.N., Sousa, D.S., Schroeder, H.K., Meinerz, J., Rigo, L.A., Bertotti, M.M., Gullo, J., Dal-Pizzol, F., Walz, R. (2009). Mortality in severe traumatic brain injury: a multivariate analysis of 748 Brazilian patients from Florianopolis City. *J. Trauma* 67, 85-90.
4. Gullo, J. S., Bertotti, M.M., Silva, C.C., Schwarzbald, M., Diaz, A.P., Soares, F.M., Freitas F.C., Junes, J., Pinheiro, J.T., Morato, E.F., Prediger, R.D., Linhares, M.N., Walz, R. (2001). Hospital mortality of patients with severe traumatic brain injury is associated with serum PTX3 levels. *Neurocritical care* 14, 194-9.
5. Soares, S.F.M., de Souza, M.N., Schwarzbald, L.M., Diaz, A.P., Nunes, C. J., Hohl, A., Nunes, A.S.P., Vieira, J., de Souza, L.R., Bertotti, M.M., Prediger, R.D.S., Linhares, M.N., Bafica, A., Walz, R. (2012). Interleukin-10 is an independent biomarker of severe traumatic brain injury prognosis. *Neuroimmunomodulation* 19, 377-85.
6. Hohl, A., Ronsoni, M.F., Debona, R., Ben, J., Schwarzbald, M.L., Diaz, A.P., Thais, M.E., Linhares, M.N., Latini, A., Prediger, R.D., Pizzol, F.D., Walz, R. (2014). Role of hormonal levels on hospital mortality for male patients with severe traumatic brain injury. *Brain Inj.* 28, 1262-9.
7. Lenzlinger, P.M., Hans, V.H., Joller-Jemelka, H.I., Trentz, O., Morganti-Kossmann, M.C., Kossmann, T. (2001). Markers for cell-mediated immune response are elevated in cerebrospinal fluid and serum after severe traumatic brain injury in humans. *J. Neurotrauma* 18, 479-89.
8. Hensler, T., Sauerland, S., Lefering, R., Nagelschmidt, M., Bouillon, B., Andermahr, J., Neugebauer, E.A. (2003). Plasma levels of procalcitonin and neopterin in multiple trauma patients with or without brain injury. *J. Neurotrauma* 20, 953-60.

9. de Lucas, R.D., Caputo, F., de Souza, K.M., Sigwalt, A.R., Ghisoni, K., Silveira, L.P.C., Remor, A.P., da Luz, S.D., Guglielmo, L.G., Latini, A. (2014). Increased platelet oxidative metabolism, blood oxidative stress and neopterin levels after ultra-endurance exercise. *J. Sports. Sci.* 32, 22-30.

10. Huber, C., Batchelor, J.R., Fuchs, D., Hausen, A., Lang, A., Niederwieser D., Reidnegger, G., Swetly, P., Troppmair, J., Wachter, H. (1984). Immune response associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J. Exp. Med.* 160, 310-6.

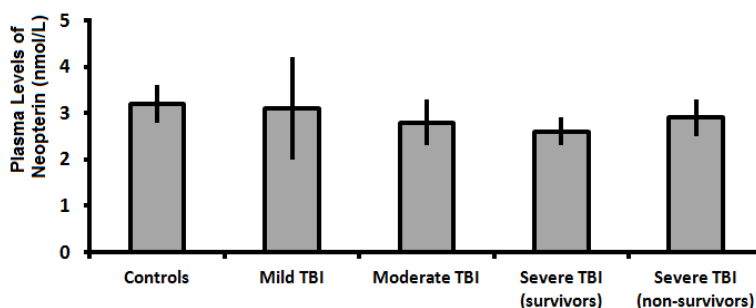


Fig 1: A. Plasma levels of neopterin expressed in nmol/L measured in a median of 11 hours (IQ range 6–19) after the hospitalization in 140 patients TBI according to the TBI severity. Mild TBI (n = 8); moderate TBI (n = 13); severe TBI who survived (n = 67) and severe TBI who died (n = 42). There were no significant differences among TBI groups and controls (ANOVA, $p = 0.42$).

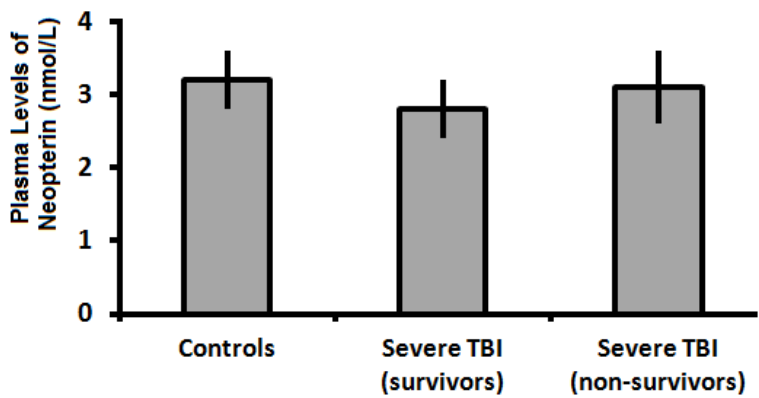


Fig 1 B. The plasma levels of neopterin remain in the normal range in a median of 30 hours (IQ range 24–37) after the hospitalization and were not associated with hospital mortality (ANOVA, $p = 0.82$).

8.3. ARTIGO PUBLICADO

Interleukin-10 Is an Independent Biomarker of Severe Traumatic Brain Injury Prognosis

SCHNEIDER SOARES, FLÁVIA MAHATMA ; MENEZES DE SOUZA, NICOLE ; LIBÓRIO SCHWARZBOLD, MARCELO ; PAIM DIAZ, ALEXANDRE ; COSTA NUNES, JEAN ; HOHL, ALEXANDRE ; NUNES ABREU DA SILVA, PRISCILLA ; VIEIRA, JULIANA ; LISBOA DE SOUZA, RAFAEL ; MORÉ BERTOTTI, MELINA ; SCHODER PREDIGER, RUI DANIEL ; NEVES LINHARES, MARCELO ; BAFICA, ANDRÉ ; WALZ, ROGER .

Interleukin-10 Is an Independent Biomarker of Severe Traumatic Brain Injury Prognosis. *Neuroimmunomodulation* (Basel), v. 19, p. 377-385, 2012. doi: 10.1159/000342141. Epub 2012 Oct 12.

Interleukin-10 Is an Independent Biomarker of Severe Traumatic Brain Injury Prognosis

Flávia Mahatma Schneider Soares^a · Nicole Menezes de Souza^d · Marcelo Liborio Schwarzbald^a
Alexandre Paim Diaz^a · Jean Costa Nunes^a · Alexandre Hohl^a · Priscilla Nunes Abreu da Silva^a
Juliana Vieira^a · Rafael Lisboa de Souza^a · Melina Moré Bertotti^f · Rui Daniel Schoder Prediger^e
Marcelo Neves Linhares^{a,b,f} · André Bafica^d · Roger Walz^{b,c}

^aCentro de Neurociências Aplicadas, ^bDepartamento de Cirurgia e ^cDepartamento de Clínica Médica, Hospital Universitário, e ^dLaboratório de Imunofarmacologia e Doenças Infecciosas, e ^eLaboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, e ^fServiço de Neurocirurgia e ^gServiço de Terapia Intensiva, Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, Brasil

Key Words

Cytokines · IL-10 · TNF- α · Traumatic brain injury · Prognosis

Abstract

Background: Cytokines have been shown to be involved in traumatic brain injury (TBI). We investigated the independent association between serum levels of IL-10 and TNF- α and hospital mortality of patients with severe TBI. **Methods:** Serum IL-10 and TNF- α levels were determined after a median period (interquartile range (IQ) 25–75) of 10 h (IQ 5–18) after severe TBI in 93 consecutive patients and in randomly selected patients with mild ($n = 18$) and moderate ($n = 16$) TBI. In patients with severe TBI, additional blood samples were analyzed 30 h (IQ 22–37) and 68 h (IQ 55–78) after TBI. Age, gender, computed tomography findings, Glasgow Coma Scale score (GCS) and pupil reactions at admission, associated trauma and hospital mortality were collected. **Results:** Elevated serum levels of IL-10, but not TNF- α , correlated significantly with GCS severity (R^2 coefficient, $p < 0.0001$) and were found to be associated with hospital mor-

talidity in patients with severe TBI. Elevated IL-10 remained associated with mortality ($p = 0.01$) in a subset of patients with isolated severe TBI ($n = 74$). Multiple logistic regression analysis showed that higher IL-10 levels (>90 pg/ml) at 10 or 30 h after TBI were 6 times (odds ratio (OR) 6.2, 95% confidence interval (CI) 1.2–25.1, $p = 0.03$) and 5 times (OR 5.4, 95% CI 1.2–25.1, $p = 0.03$), respectively, more frequently associated with hospital mortality than lower levels (<50 pg/ml), independently of age, GCS as well as pupil reactions at admission and associated trauma. **Conclusions:** Serum IL-10 levels may be a useful marker for severe TBI prognosis.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a leading cause of mortality [1, 2] and disability [3–5] among young adults and constitutes a major health and socioeconomic problem throughout the world. The extent of brain damage is determined by the severity of the primary mechanical injury and the consequences of secondary biomolecular in-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel
1021-7401/12/0196-0377\$38.00/0
Accessible online at:
www.karger.com/nim

Roger Walz, MD, PhD
Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário, 3^o andar
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário 88.040-970, Trindade
Florianópolis, SC, 88040-900 (Brazil)
E-Mail rogerwalz@hotmail.com

jury cascades, which cause neuroinflammation and contribute to cerebral edema, enhanced intracranial pressure and delayed cellular damage [6–12]. TBI results in early inflammatory responses initiated by the release of diverse immune mediators as well as infiltration of polymorphonuclear leukocytes, which guide a sequence of events including expression of adhesion molecules, cellular infiltration, and additional secretion of inflammatory molecules and growth factors, resulting in either regeneration or cell death [9–14].

Cytokines are critical mediators of neuroinflammation after TBI [7, 8, 11], regulating a wide variety of cellular functions through autocrine and paracrine signaling networks that may maintain uncontrolled immunopathology [8]. Increased synthesis and release of various pro- and anti-inflammatory cytokines into the CNS and blood is associated with severe TBI [6]. In animal models, for example, the induction of TNF- α and IL-1 β peaks early within 3–8 h after injury, followed by more sustained elevations of IL-6 and IL-10 [13, 15]. TNF- α and IL-10 are produced in high concentrations by resident microglia and infiltrating monocytes/macrophages in the acute phase of injury [12]. Astrocyte reactivity is stimulated by inflammatory cytokines, contributing to increased neuroinflammation and the development of secondary injury following neurotrauma [14].

Association studies in human TBI may help to identify biomarkers of prognosis as well as targets to develop more focused treatment strategies. Previous studies have demonstrated the association between cerebrospinal fluid or blood levels of different cytokines and human TBI, but their relatively small sample sizes of patients, selection bias, inadequate handling of missing data and the confounding bias leave doubts about the independent association between cytokines and patients' prognosis. In the present study, we prospectively investigated the independent association between serum levels of anti-inflammatory IL-10 and pro-inflammatory TNF- α cytokines and hospital mortality of patients with severe TBI using a multiple logistic regression analysis.

Patients and Methods

We prospectively included 93 consecutive adult patients (age 18–79 years) with severe TBI from the metropolitan area of Florianópolis city (Santa Catarina state, southern Brazil), admitted to the intensive care unit (ICU) of the Hospital Governador Celso Ramos between April 2006 and September 2008, who met the inclusion criterion. The inclusion criterion was a Glasgow Coma Scale score (GCS) ≤ 8 at hospital admission. Because of the low

number of cases, victims of gunshot injuries and patients who died from brain death within 24 h after admission were excluded. For comparison, we randomly selected patients with mild TBI (GCS = 13–15, $n = 16$) and moderate TBI (GCS = 9–12, $n = 18$), who came to our emergency room during the same time period and agreed to participate in the study. Informed consent was obtained from patients (mild cases) or their families (moderate and severe cases). The research protocol was approved by the Universidade Federal de Santa Catarina's Ethics Committee for Human Research (protocol 163/2005).

The demographic and hospital variables analyzed were: age, gender, computed tomography (CT) findings according to the Marshall CT classification [16] and presence of subarachnoid hemorrhage, presence of associated trauma (thorax, abdomen or limbs), GCS and pupil examination at admission. A blinded CT analysis was done during hospitalization by one of the researchers (M.M.B.) and confirmed by another (M.N.L.) when necessary. Most of these variables, isolated or combined, were proven to be associated with TBI outcome in our patients and other populations [1, 2, 16–20]. The analyzed outcome was death during hospitalization. The secondary end point was the incidence of nosocomial infections (pneumonia and urinary tract) and time to mechanical ventilation.

Blood samples were collected from all included patients on the first day after hospital admission (in the emergency room or ICU). Two additional samples were collected from patients with severe TBI according to the research team's schedule between the second and fourth day after ICU admission. Blood samples of patients admitted on weekends were collected on Monday mornings. The time span between TBI and blood sampling was determined by one of our investigators using the information collected from the rescue registration forms that were highly accurate. A volume of 5 ml peripheral venous blood was collected and centrifuged. The serum was stored for 24 h at -20°C and then at -70°C until cytokine analysis.

To investigate the association between serum cytokine levels and TBI severity after an injury, we performed an initial screening of the single blood sample collected from patients with mild and moderate TBI and of the first sample collected from patients with severe TBI ($n = 11$ patients/group). The serum sample was chosen in a randomized manner blinded to all hospitalization variables except the severity of trauma determined by the GCS. The cytokine analysis was blinded to the hospitalization variables and outcome of patients. For this initial serum cytokine screening, flow cytometry was employed using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine kit (BD Biosciences, San Diego, Calif., USA). The CBA kits detect the following cytokines: IL-2 and IL-4 (detection limit 2.6 pg/ml), IL-5 (detection limit 2.4 pg/ml), IL-10 and TNF- α (detection limit 2.8 pg/ml), and IFN- γ (detection limit 7.1 pg/ml). Briefly, serum samples were incubated with the 6 cytokine capture beads and PE-conjugated detection antibodies for 3 h at room temperature. Samples were then washed and data acquired using either a FACSCalibur or a FACS Cantoll (BD Biosciences). Sample results were generated in graphical and tabular format using the GraphPad Prism 5.0i.

Following cytokine measurements using CBA, confirmatory enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) commercial kits (e-Biosciences) were employed in serum samples from a larger number of cases with severe ($n = 93$), moderate ($n = 18$) and mild ($n = 16$) TBI.

Statistical Analysis

The normality of the continuous variables was determined by the one-sample Kolmogorov-Smirnov test. The correlation between serum cytokines and the severity of trauma (GCS) was analyzed by Spearman's test (for non-parametric data) or Pearson's test (for parametric data). Because of the asymmetric sample size of the groups, we used a non-parametric analysis (Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney test) to study the differences in the cytokine levels among patients with mild, moderate and severe (survivors and non-survivors) TBI. Differences among the serum cytokine levels of the three blood samples collected from patients with severe TBI were analyzed by Wilcoxon signed ranks test. The Kaplan-Meier curve was used to establish the cumulative probability of survival according to the IL-10 serum levels. Differences of cumulative survival between the categorical IL-10 groups were determined by the log-rank test.

The association between hospital mortality and continuous variables was analyzed by the Mann-Whitney test because of the relative asymmetry in the sample size of survivors and non-survivors. Continuous variables were also categorized. A univariate analysis using Cox's proportional hazards model was applied to identify demographic, clinical, radiological and neurosurgical variables and cytokine levels independently associated with hospital mortality. Variables showing a level of association with a p value ≤ 0.15 were included in the multivariate analysis using Cox's proportional hazards model.

As there was a biological plausibility to our study design and in order to avoid a type II error, we did not employ any adjustments for the multiple tests using a more stringent cut-off level for "p" level to minimize the possible bias affecting the cytokine levels due to multiple organ injuries, the variable 'associated trauma' was also included in the multivariate analysis. We also performed a separate analysis of association between serum IL-10 levels and hospital mortality of patients with isolated severe TBI only. All missing cases occurred by chance and are clearly described in the results tables.

The association between serum IL-10 levels and the occurrence of pneumonia or urinary tract infection was analyzed by Cox's proportional hazards model. The association between time under mechanical ventilation and serum IL-10 levels was analyzed using Spearman's test. Statistical analysis was done using the SPSS program 17.0 (Chicago, Ill, USA).

Results

Blood samples were collected within a median period (interquartile range (IQ) 25–75) of 10 h (IQ 5–18), 30 h (IQ 22–37) and 68 h (IQ 55–78) following TBI. To evaluate the elicited pro- and anti-inflammatory associated cytokine levels early on during TBI, we utilized CBA as a screening method in randomized patients' serum samples. Serum IL-2, IL-4, IL-5 and IFN- γ levels were found to be undetectable in all evaluated groups (data not shown). These cytokines were also undetectable in samples collected at the first (median 12 h, IQ 8–20), second (median 34 h, IQ 23–37), and third (median 65 h, IQ 56–79) time point after

severe TBI ($n = 9$ patients/time point; data not shown). In contrast, increased levels of TNF- α and IL-10 were detected in the serum of TBI patients by CBA or ELISA. In addition, there were no statistically significant differences in the periods between TBI and blood sample collection from the three studied groups: severe ($n = 93$), moderate ($n = 18$) and mild ($n = 16$) TBI (Kruskal-Wallis, $p = 0.23$; data not shown). Despite the early augmentation of serum TNF- α levels after TBI, no significant correlation was observed between this parameter and the severity of the trauma (determined by GCS) and hospital mortality (fig. 1). However, serum IL-10 measurements displayed a statistically significant correlation with TBI severity determined by GCS (fig. 2a). These results are in accordance with previous findings [21], indicating that IL-10 is rapidly produced following TBI. These evidences indicate that TBI severity correlates with this anti-inflammatory cytokine during TBI. Such a hypothesis is supported since in the subset of patients with severe TBI (GCS ≤ 8), non-survivors were found to display higher amounts of serum IL-10 than survivors (fig. 2b).

Additionally, we performed an association analysis between IL-10 levels (serum collected at the first ($n = 74$) or second ($n = 60$) time point after trauma) and hospital mortality of patients with isolated severe TBI. Patients with severe TBI who died showed a significantly higher serum IL-10 level than survivors. At the first time point, the median serum IL-10 level (IQ 25–75) from non-survivors was found to be 120 pg/ml (IQ 60–260), which is significantly higher than that from survivors (70 pg/ml, IQ 40–110; $p = 0.01$). A similar result was observed in samples collected at the second time point, which displayed IL-10 levels of 60 pg/ml (IQ 40–80) for survivors and 90 pg/ml (IQ 50–140) for non-survivors ($p = 0.02$). There were no statistically significant differences ($p = 1.0$) between IL-10 levels measured in samples collected at the third time point after trauma (data not shown). In addition, serum TNF- α levels in samples from the three time points were also similar in survivors and non-survivors with isolated severe TBI ($p > 0.29$). These results demonstrate that serum IL-10 levels may predict hospital mortality in patients with isolated TBI or in TBI associated with lesions in other organs.

All patients with mild TBI survived and only 1 patient with moderate TBI died. The Kaplan-Meier survival curves comparing the cumulative percentages of patients who survived according to their serum IL-10 levels (in pictograms per milliliters) measured 10 h after severe TBI are presented in figure 3. Patients with serum IL-10 levels < 50 pg/ml showed a significantly higher chance to sur-

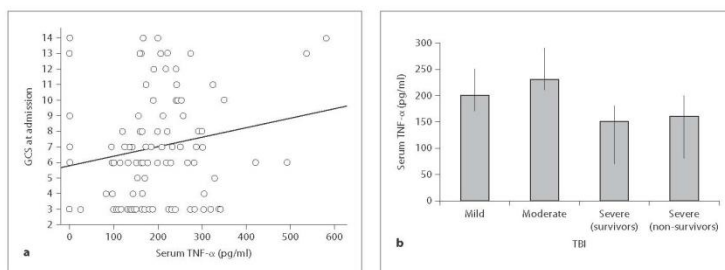


Fig. 1. a Correlation between the GCS at admission and serum TNF- α , determined by ELISA, measured in the blood sample collected after a median period of 10 h (IQ 25–75 = 5–18) after TBI. There is a trend for a positive correlation between the GCS at admission and serum TNF- α (Pearson's correlation coefficient = 0.16, $p = 0.08$). **b** Serum TNF- α , determined by ELISA,

measured after 11 h (IQ 25–75 = 4–13) in patients with severe (survivors and non-survivors), moderate and mild TBI. There was no statistically significant difference in the serum TNF- α levels among patients with severe (survivors and non-survivors), moderate and mild TBI ($p = 0.23$). Data are expressed as medians and IQ ranges.

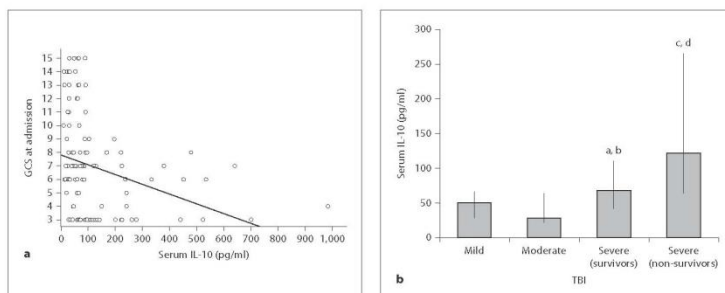


Fig. 2. a Correlation between the GCS at admission and serum IL-10, determined by ELISA, measured in the blood sample collected after a median period of 10 h (IQ 25–75 = 5–18) after TBI. There is a significant negative correlation ($p < 0.0001$) between the GCS at admission and serum IL-10 (Spearman's correlation coefficient = -0.42). **b** Serum IL-10, determined by ELISA, measured in patients with severe (survivors and non-survivors), moderate and mild TBI. The non-survivors with severe TBI ($n = 35$) showed a significant enhancement in serum IL-10 in comparison

to survivors ($n = 58$) and patients with moderate ($n = 18$) or mild ($n = 16$) TBI. ^a Significant difference ($p < 0.001$) between survivors with severe TBI and patients with mild TBI. ^b Significant difference ($p < 0.001$) between survivors with severe TBI and patients with moderate TBI. ^c Significant difference ($p < 0.02$) between non-survivors with severe TBI and patients with moderate TBI. ^d Significant difference ($p < 0.01$) between survivors and non-survivors with severe TBI. Data are expressed in medians and IQ ranges.

vive than patients with higher levels ($p < 0.01$). There were no differences in the survival rates of patients with serum IL-10 levels between 50 and 90 pg/ml and those with levels >90 pg/ml ($p = 0.73$). Similar results were observed with IL-10 levels determined from the second blood sample (data not shown).

The clinical, demographic, radiological and neurosurgical variables, serum IL-10 levels and hospital mortality of patients with severe TBI are shown in table 1. The mean age of our patients was 35 years and 82% were male. Thirty-five patients died during hospitalization, and TBI itself was the cause of death in 32 patients. One patient died due to heart infarction, one due to pneumonia, pleural effusion and cardiac arrest and one due to pneumonia evolving to sepsis, renal failure and cardiac arrest. These 3 patients died after the third blood sample collection. Hospital mortality was not associated with gender, CT findings at admission, associated trauma or the respiratory and hemodynamic parameters at ICU admission ($p \geq 0.30$). There was a non-significant trend for a higher mortality of patients older than 44 years (hazard ratio (HR) 1.6, 95% confidence interval (CI) 0.8–3.2, $p = 0.15$).

A GCS ≤ 5 at hospital admission was almost 3 times more frequently associated with hospital mortality than higher GCS (crude HR 2.9, 95% CI 1.2–7.1, $p = 0.02$). Pupil abnormalities at hospital admission were approximately 4 times more frequently present in non-survivors than in survivors (crude HR 3.7, 95% CI 3.7–8.2, $p = 0.001$). Importantly, the univariate analysis showed an association between higher IL-10 levels and hospital mortality. A serum IL-10 level >90 pg/ml in the first blood sample was 6 times more frequently associated with death than an IL-10 level ≤ 50 pg/ml (crude HR 6.5, 95% CI 1.5–27.7, $p = 0.01$). Serum IL-10 levels between 50 and 90 pg/ml in the first sample were also 6 times more frequently associated with death (crude HR 5.7, 95% CI 1.3–25.4, $p = 0.02$). Concerning serum IL-10 level determination in the second blood sample, there was a non-significant trend for an association between cytokine levels >90 pg/ml and hospital mortality (crude HR 1.9, 95% CI 0.8–4.7, $p = 0.18$) in comparison to lower levels. Serum IL-10 levels measured in the third blood sample were not associated with hospital mortality ($p \geq 0.30$). All these results remained unaltered when deaths not attributed to brain death were excluded (data not shown). The time span between TBI and the 3 blood sample collections does not differ between survivors and non-survivors ($p > 0.22$; table 1).

The multiple Cox proportional hazards model analysis is shown in table 2. The presence of higher serum IL-10 levels (>90 pg/ml) in the first and second blood sample

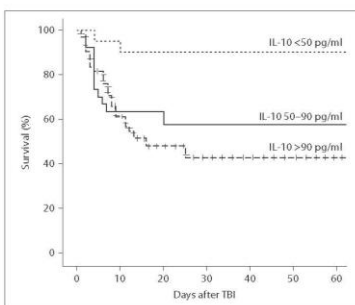


Fig. 3. Kaplan-Meier survival curves comparing the cumulative percentages of patients who survived according to their serum IL-10 levels measured 10 h after severe TBI. Patients with serum IL-10 levels <50 pg/ml showed a significantly higher chance to survive than patients with higher levels (log-rank test, $p < 0.01$). There were no differences in the survival rates of patients with serum IL-10 levels between 50 and 90 pg/ml and those with levels >90 pg/ml (log-rank test, $p = 0.73$).

collected after severe TBI was significantly more frequently associated with hospital mortality than lower levels (<50 pg/ml): adjusted HR 4.1, 95% CI 1.1–18.9 ($p = 0.04$) versus adjusted odds ratio (OR) 5.4, 95% CI 1.2–25.1 ($p = 0.03$), respectively. These results were independently of age, GCS and pupils at admission or the presence of associated trauma (table 2). A serum IL-10 level between 50 and 90 pg/ml measured in the first blood sample shows a non-significant trend of independent association with death in comparison to lower levels (adjusted OR 4.8, 95% CI 0.8–27.7, $p = 0.08$). We included the variable 'associated trauma' in the final model of the multiple Cox proportional hazards model analysis to control for a possible confounding bias related to IL-10 changes due to the presence of other organ lesions.

The multiple Cox proportional hazards models are presented in table 2. After adjusting for pupil abnormalities at admission, GCS, age and associated trauma, a serum IL-10 level between 50 and 90 pg/ml at 10 h after severe TBI was 4 times more frequently associated with hospital mortality than lower levels (adjusted HR 4.0, 95% CI 0.9–18.5, $p = 0.07$). The same independent HR for death was observed for serum IL-10 levels >90 pg/ml in comparison with lower levels (adjusted HR 4.1, 95% CI

Table 1. Clinical, demographic, radiological and neurosurgical variables and serum IL-10 levels according to hospital mortality

Variable	All patients with severe TBI (n = 93)	Survivors (n = 58)	Non-survivors (n = 35)	Crude HR for death (95% CI)	p value
Mean age \pm SD, years	35.4 \pm 15.7	34.0 \pm 15.9	37.5 \pm 17.0	N.A.	
Age groups					
18–44 years	67 (72.0)	45 (77.6)	22 (62.9)	1.0	
>44 years	26 (28.0)	13 (22.4)	13 (37.1)	1.6 (0.8–3.2)	0.15
Gender					
Male	77 (82.8)	49 (84.5)	28 (80.0)	1.0	
Female	16 (17.2)	9 (15.5)	7 (20.0)	1.0 (0.4–2.3)	0.98
Marshall CT classification ^a					
Type I injury	4 (4.3)	3 (5.2)	1 (2.9)	1.0	
Type II injury	22 (23.7)	16 (27.6)	6 (17.1)	0.7 (0.01–5.2)	0.62
Type III injury	14 (15.1)	9 (15.5)	5 (14.3)	1.0 (0.1–8.4)	0.97
Type IV injury	7 (7.5)	5 (8.6)	2 (5.7)	0.7 (0.1–7.8)	0.78
Evacuated mass lesion	21 (22.6)	13 (22.4)	8 (22.9)	1.0 (0.1–8.3)	1.0
Non-evacuated lesion	22 (23.7)	10 (17.2)	12 (34.3)	1.7 (0.2–13.0)	0.62
SAH ^a					
No	39 (41.9)	25 (43.9)	14 (41.2)	1.0	
Yes	52 (55.9)	32 (56.1)	20 (58.8)	0.8 (0.5–2.0)	0.98
Associated trauma					
No	61 (65.6)	37 (63.8)	24 (68.6)	0.9 (0.39–1.9)	0.74
Yes	32 (34.4)	21 (36.2)	11 (31.4)	1.0	
GCS at admission					
7 or 8	28 (30.1)	22 (37.9)	6 (17.1)	1.0	
5 or 6	21 (22.6)	16 (27.6)	5 (14.3)	1.1 (0.3–3.6)	0.88
3 or 4	44 (47.3)	20 (34.5)	24 (68.6)	2.9 (1.2–7.1)	0.02
Pupils at admission					
Isocoric	45 (48.4)	37 (63.8)	8 (22.9)	1.0	
Abnormal	48 (51.6)	21 (36.2)	27 (77.1)	3.7 (1.7–8.2)	0.001
Mean respiratory and hemodynamic parameters \pm SD at admission to the ICU					
Heart rate, bpm	89 \pm 21	89 \pm 20	90 \pm 24	N.A.	0.83
Respiratory rate, breaths/min	20 \pm 10	20 \pm 12	18 \pm 4	N.A.	0.87
Systolic blood pressure, mm Hg	125 \pm 9	126 \pm 29	124 \pm 28	N.A.	0.73
Diastolic blood pressure, mm Hg	74 \pm 20	76 \pm 18	71 \pm 21	N.A.	0.30
PEEP	6 \pm 5	7 \pm 7	6 \pm 4	N.A.	0.58
First serum sample collection, n	93	58	35		
Time after TBI, h	10 (5–18)	10 (5–22)	10 (4–15)	N.A.	0.22
Serum IL-10 levels, pg/ml	80 (50–160) ^d	70 (40–120)	110 (60–240)	N.A.	<0.0001
IL-10 <50 pg/ml	21 (22.6)	19 (32.2)	2 (5.7)	1.0	
IL-10 50–90 pg/ml	33 (35.5)	21 (35.6)	13 (37.1)	5.7 (1.3–25.4)	0.02
IL-10 >90 pg/ml	39 (41.9)	19 (32.2)	20 (57.1)	6.5 (1.5–27.7)	0.01
Serum TNF- α , pg/ml	160 (120–230)	160 (120–230)	160 (120–200)	N.A.	0.78
Second serum sample collection, n ^b	76	47	29		
Time after TBI, h	30 (22–37) ^e	30 (21–37)	27 (22–35)	N.A.	0.37
Serum IL-10 levels, pg/ml	70 (40–110)	70 (40–90)	90 (50–150)	N.A.	0.02
IL-10 <50 pg/ml	23 (30.3)	16 (34.0)	7 (24.1)	1.0	
IL-10 50–90 pg/ml	29 (31.2)	20 (42.6)	9 (25.7)	0.9 (0.03–2.6)	0.92
IL-10 >90 pg/ml	24 (25.8)	11 (23.4)	13 (44.8)	1.9 (0.8–4.7)	0.18
Serum TNF- α , pg/ml	210 (180–250) ^f	210 (190–260)	210 (170–230)	N.A.	0.55
Third serum sample collection, n ^c	44	31	13		
Time after TBI, h	68 (55–78)	71 (61–80)	67 (54–76)	N.A.	
Serum IL-10 levels, pg/ml	40 (30–70)	40 (30–60)	60 (30–100)	N.A.	0.28
IL-10 <50 pg/ml	25 (26.9)	19 (61.3)	6 (46.2)	1.0	
IL-10 50–90 pg/ml	13 (29.5)	9 (29.0)	4 (30.8)	1.5 (0.4–5.3)	0.53
IL-10 >90 pg/ml	6 (13.6)	3 (9.7)	3 (23.1)	2.1 (0.5–8.2)	0.30

(For table footnote see next page.)

1.1–18.9, $p = 0.04$). A serum IL-10 level >90 pg/ml determined 30 h after severe TBI was 2 times more frequently associated with death than lower levels (adjusted HR 2.5, 95% CI 1.09–6.39, $p = 0.03$).

The IL-10 levels from the third blood sample were not included in the multiple Cox proportional hazards model because they were not associated with prognosis in the univariate analysis and there was a large number of samples missing. Altogether, these data indicate that IL-10 produced early on in the serum is an independent factor predicting TBI outcome.

Thirty-eight (41%) patients developed pneumonia and 9 (10%) urinary tract infection. The serum IL-10 levels determined 10 or 30 h after severe TBI were not associated with the occurrence of pneumonia or urinary tract infection ($p > 0.26$ by log-rank test) and did not correlate with the time to mechanical ventilation (R^2 correlation < -0.15 , $p > 0.27$).

Discussion

The present study demonstrates that elevated serum IL-10 levels, but not TNF- α levels, after TBI are independently associated with hospital mortality in patients with severe TBI. As previously demonstrated by others, the initial production of IL-10 in serum increases within the first 3 days after an injury [19, 20, 22]. Despite statistically significant correlations between IL-10 and GCS, the clinical relevance of this association may be not relevant ($r^2 = -0.42$) and may be influenced by some extreme values.

The association between higher serum IL-10 levels and mortality due to TBI was previously demonstrated by Bell et al. [20] in children and adults with body injury including some patients without TBI [23], but these findings were not further confirmed by Dziurdzik et al. [19] in adult patients with TBI. The small sample sizes of patients of these previous studies may help to explain, at least in part, their

contradictory findings. The observed enhanced serum IL-10 levels may be due to an additional extracranial injury [24], or a rapid secretion of monocyte populations after a sympathetic activation in isolated TBI [25] or it may even be produced in high concentrations by resident microglia and infiltrating monocytes/macrophages in the acute phase of injury [12]. The latter mechanism may also contribute to the elevation of serum TNF- α levels [12]. Corroborating previous literature [12], we observed that TNF- α was detected in serum after the first 2 days after severe TBI. However, this cytokine was found to be not associated with TBI severity measured by GCS and neither with hospital mortality in patients with severe TBI.

The present data support that the association between elevated serum IL-10 measured after severe TBI and hospital mortality in the cohort reported here is not spurious because: (1) the hypothesis was tested using an adequate sample size of patients; (2) the possible imbalanced distribution of variables between survivors and non-survivors, shown to be independently associated with the prognosis of severe TBI, has been controlled for by the regression analysis, and (3) the observed unaltered levels of IL-2, IL-4, IL-5 and IFN- γ measured in 30 patient samples reduce the possibility of changes in cytokine levels due to an unspecific reaction to injury.

IL-10 enhances the pentraxin 3 (PTX3), a humoral component of the innate immune system, production by dendritic cells of myelomonocytic origin [26], and recently we have demonstrated that serum PTX3 levels are also independently associated with hospital mortality in patients with severe TBI [9]. Taken together, these findings may suggest an interaction or independent participation of IL-10 and PTX3 in TBI-induced immunological changes. Nevertheless, the present study design, which was similar to that applied in the PTX3 study [9], does not allow us to further address whether the observed serum IL-10 and PTX3 enhancement in non-survivors is protective or deleterious.

(Footnote from table 1.)

Values are numbers (with percentages in parentheses) or means (with IQ 25–75 in parentheses), as appropriate and unless otherwise noted.

HR = Hazard ratio determined by Cox's proportional hazards model; N/A = not applicable; SAH = subarachnoid haemorrhage; PEEP = positive end-expiratory pressure.

^a CT was not analyzed in 2 cases. ^b Serum IL-10 was not examined in 17 patients in the second blood sample; 7 patients had died before the sampling time, and in 10 the second sample was not collected by the research team. ^c Serum IL-10 was not examined

in 49 patients on the third day; 10 had died before the sampling time, and in 39 the third sample was not collected by the research team. ^d The serum IL-10 levels decreased significantly in the second and third sample compared with the first sample ($p \leq 0.005$). ^e The serum IL-10 levels in the third sample was significantly lower than in the second blood sample ($p < 0.05$). ^f There was a significant enhancement in the TNF- α level of the second sample in comparison to the first blood sample. TNF- α was not measured in the third blood sample.

Table 2. Independent association between serum IL-10 levels measured on the first and second day after severe TBI and hospital mortality

Variable	All patients with severe TBI (n = 93)	Survivors (n = 58)	Non-survivors (n = 35)	Adjusted HR ^a for death (95% CI)	p value	Adjusted HR ^b for death (95% CI)	p value
Age groups							
18–44 years	67 (72.0)	45 (77.6)	22 (62.9)	1.0		1.0	
>44 years	26 (28.0)	13 (22.4)	13 (37.1)	1.5 (0.7–3.1)	0.30	1.9 (0.9–4.3)	0.09
Associated trauma							
Yes	32 (34.4)	21 (36.2)	11 (31.4)	1.0		1.0	
No	61 (65.6)	37 (63.8)	24 (68.6)	1.2 (0.6–2.8)	0.54	1.3 (0.5–3.2)	0.54
GCS at admission							
7–8	28 (30.1)	22 (37.9)	6 (17.1)	1.0		1.0	
5–6	21 (22.6)	16 (27.6)	5 (14.3)	1.6 (0.5–5.6)	0.45	1.3 (0.3–5.0)	0.71
3–4	44 (47.3)	20 (34.5)	24 (68.6)	2.4 (1.0–5.9)	0.05	2.8 (1.0–7.5)	0.04
Pupils at admission							
Isocoric	45 (48.4)	37 (63.8)	8 (22.9)	1.0		1.0	
Anisocoric	48 (51.6)	21 (36.2)	27 (77.1)	3.2 (1.4–7.2)	0.005	3.6 (1.4–9.4)	0.01
First blood sample collection, n	93	58	35				
IL-10 <50 pg/ml	21 (22.6)	19 (32.2)	2 (5.7)				
IL-10 50–90 pg/ml	33 (35.5)	21 (35.6)	13 (37.1)	4.0 (0.9–18.5)	0.07	N.A.	N.A.
IL-10 >90 pg/ml	39 (41.9)	19 (32.2)	20 (57.1)	4.1 (1.1–18.9)	0.04	N.A.	N.A.
Second blood sample collection, n	76	47	29				
IL-10 <50 pg/ml	23 (30.3)	16 (34.0)	7 (24.1)	N.A.	N.A.	1.0	
IL-10 50–90 pg/ml	29 (31.2)	20 (42.6)	9 (25.7)	N.A.	N.A.	1.3 (0.5–3.8)	0.58
IL-10 >90 pg/ml	24 (25.8)	11 (23.4)	13 (44.8)	N.A.	N.A.	2.5 (1.1–6.4)	0.03

All values are numbers (with percentages in parentheses).

N.A. = Not applicable.

^a HR adjusted for age, associated trauma, GCS at admission, pupils at admission and serum IL-10 measured in the first collected blood sample. ^b HR adjusted for age, associated trauma,

GCS at admission, pupils at admission and serum IL-10 measured in the second collected blood sample. Serum IL-10 was not examined in 17 patients on the second day; 7 patients had died before the sampling time, and in 10 the second blood sample was not collected.

Importantly, emerging evidence implicates the nature of IL-10 to possible neuroprotective effects elicited by inflammatory settings. IL-10 reduces pro-inflammatory responses after ischemic stroke primarily by acting on the glia and endothelium, but it also protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways [27]. We speculate that the observed IL-10 enhancement contributes directly and indirectly to neuroprotection after TBI. Interestingly, Knoblich and Faden [28] showed that systemic (intravenous or subcutaneous) but not intracerebroventricular administration of IL-10 improved neurological outcomes in a lateral fluid-percussion model of TBI, suggesting that IL-10-associated pathways could also serve as a therapeutic target for TBI treatment. This question merits further investigation.

If confirmed in other populations, our findings could indicate that IL-10 may be a useful biomarker of TBI severity. The association between serum IL-10 levels

and both early and long-term outcomes evaluated by fine motor skills, cognitive and psychiatric evaluation as well as quality of life aspects is an important point to be further investigated in patients with TBI.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, the Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência and the Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Santa Catarina (all from Brazil). R.D.S.P., A.B. and R.W. are supported by research fellowships from CNPq – Brazil. The authors received technical support for the biological sample collection from the Laboratório Biomédico (Florianópolis) under the supervision of Pharm. Saulo Correia de Mello. The authors thank all medical and nursing staff of the Serviço de Terapia Intensiva (Hospital Governador Celso Ramos) for their kind cooperation during the study.

References

- 1 Martins ET, Linares MN, Sousa DS, et al: Mortality in severe traumatic brain injury: a multivariate analysis of 748 patients from Florianópolis city. *J Trauma* 2009;67:85–90.
- 2 MRC CRASH Trial Collaborators, Perel P, Arango M, Clayton T, Edwards P, Komolafe E, Pocock S, Roberts I, Shakur H, Steyerberg E, Yuthakasemsunt S: Predicting outcome after traumatic brain injury: practical prognostic models based on large cohort of international patients. *BMJ* 2008;336:425–429.
- 3 Diaz AP, Schwarzbald ML, Thais ME, Hohl A, Bertotti MM, Schmoeller R, Nunes JC, Prediger R, Linares MN, Guarnieri R, Walz R: Psychiatric disorders and health-related quality of life after severe traumatic brain injury: a prospective study. *J Neurotrauma* 2012;29:1029–1037.
- 4 Thais ME, Cavallazzi G, Schwarzbald ML, Diaz AP, Ritter C, Petronilho F, Hohl A, Prediger RD, Linares MN, Pizzol FD, Walz R: Plasma levels of oxidative stress biomarkers and long term cognitive performance after severe head injury. *CNS Neurosci Therap* 2012;18:606–608.
- 5 Schwarzbald M, Diaz A, Martins ET, Rufino A, Amante LN, Thais ME, Quevedo J, Hohl A, Linares MN, Walz R: Psychiatric disorders and traumatic brain injury. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008;4:797–816.
- 6 Lu J, Goh SJ, Ting PY, et al: Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. *Front Biosci* 2009;14:3795–3813.
- 7 Kadhimi HJ, Duchateau J, Sebire G: Cytokines and brain injury: invited review. *J Intensive Care Med* 2008;23:236–249.
- 8 Soriano SG, Piva S: Central nervous system inflammation. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 2008;42:154–159.
- 9 Gullo JS, Bertotti MM, Silva CC, Schwarzbald M, Diaz AP, Soares FM, Freitas FC, Nunes J, Pinheiro JT, Morato EF, Prediger RD, Linares MN, Walz R: Hospital mortality of patients with severe traumatic brain injury is associated with serum PTX3 levels. *Neurocrit Care* 2011;14:194–199.
- 10 Schwarzbald ML, Rial D, De Bem T, Machado DG, Cunha MP, dos Santos AA, dos Santos DB, Figueiredo CP, Farina M, Goldfeder EM, Rodrigues AL, Prediger RD, Walz R: Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. *J Neurotrauma* 2010;27:1883–1893.
- 11 Engelhardt B: Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines. *J Neurol Sci* 2008;274:23–26.
- 12 D'Mello C, Le T, Swain MG: Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor alpha signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci* 2009;29:2089–2102.
- 13 Kirchhoff C, Buhmann S, Bogner V, et al: Cerebrospinal IL10 concentration is elevated in non-survivors as compared to survivors after severe traumatic brain injury. *Eur J Med Res* 2008;13:464–468.
- 14 Laird MD, Vender JR, Dhandapani KM: Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury. *Neurosignals* 2008;16:154–164.
- 15 Maas AI, Steyerberg EW, Butcher I, et al: Prognostic value of computerized tomography scan characteristics in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J Neurotrauma* 2007;24:303–314.
- 16 McHugh GS, Engel DC, Butcher I, et al: Prognostic value of secondary insults in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J Neurotrauma* 2007;24:287–293.
- 17 Murray GD, Butcher I, McHugh GS, et al: Multivariable prognostic analysis in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J Neurotrauma* 2007;24:329–337.
- 18 Van Beek JG, Mushkudiani NA, Steyerberg EW, et al: Prognostic value of admission laboratory parameters in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J Neurotrauma* 2007;24:315–328.
- 19 Dziurdzik P, Krawczyk L, Jalowiecki P, Kondra-Anasz Z, Menon L: Serum interleukin-10 in ICU patients with severe acute central nervous system injuries. *Inflamm Res* 2004;53:338–343.
- 20 Bell MJ, Kochanek PM, Doughty LA, et al: Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 1997;14:451–457.
- 21 Marmarou A, Lu J, Butcher I, et al: Prognostic value of the Glasgow Coma Scale and pupil reactivity in traumatic brain injury assessed pre-hospital and on enrollment: an IMPACT analysis. *J Neurotrauma* 2007;24:270–280.
- 22 Csuka E, Morganti-Kossmann MC, Lenzenlinger PM, Joller H, Trentz O, Kossmann T: IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF beta1 and blood-brain barrier function. *J Neuroimmunol* 1999;101:211–221.
- 23 Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, et al: Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J Trauma* 1997;42:863–870.
- 24 Shiozaki T, Hayakata T, Tasaki O, et al: Cerebrospinal fluid concentrations of anti-inflammatory mediators in early-phase severe traumatic brain injury. *Shock* 2005;23:406–410.
- 25 Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, et al: Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med* 1998;4:808–813.
- 26 Doni A, Michela M, Bottazzi B, Peri G, Valentini S, Polentarutti N, Garlanda C, Mantovani A: Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 2006;79:797–802.
- 27 Sharma S, Yang B, Xi X, Grotta JC, Aronowski J, Savitz SI: IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways. *Brain Res* 2011;1373:189–194.
- 28 Knoblich SM, Faden AE: Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 1998;153:143–151.

9. ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM SERES HUMANOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS
Parecer Consubstanciado Projeto nº 163/2005

I – Identificação-

Data de entrada no CEP: 09/05/2005

Título do Projeto: Neurotrauma: bases fisiopatológicas, diagnóstico, fatores prognósticos e tratamento.

Pesquisador Responsável: Roger Walz

Pesquisador Principal: Evandro Tostes Martins

Propósito: Não referido.

Instituição onde se realizará: Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis –SC.

- II- Objetivos:
1. Determinar os fatores de risco para mortalidade intra-hospitalar no TCE grave.
 2. Determinar os fatores de risco para a morbi-mortalidade a longo prazo de pacientes com TCE grave.
 3. Investigar a existência ou não de modificação nos níveis séricos de peroxidação de lipídeos e proteínas em pacientes com TCE grave.
 4. Investigar se existem modificações nos níveis e atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em pacientes com TCE grave.
 5. Determinar a existência ou não de associação entre as modificações nos níveis séricos de peroxidação de lipídeos e proteínas e nos níveis e atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase e a morbi-mortalidade de pacientes com TCE grave.
 6. Criar um modelo de regressão logística múltipla que permita estimar o risco de morbidade e mortalidade de pacientes com TCE grave, baseando-se em informações clínicas, demográficas, radiológicas, neurocirúrgicas e bioquímicas.

III- Sumário do Projeto: Neste projeto será analisada a mortalidade intra-hospitalar e após a alta de 700 pacientes consecutivos atendidos com TCE grave (Glasgow após a ressuscitação igual ou inferior a 8) atendidos no período de 1993 e 2004 no Hospital Governador Celso Ramos. Trata-se de um estudo prospectivo. O maior número possível de pacientes que receberam alta hospitalar serão conectados/localizados através de telefone ou telegrama por bolsistas de iniciação científica adequadamente treinados pelo coordenador do projeto e pelo pesquisador responsável. Estes bolsistas irão coletar informações relacionadas à sobrevivência dos pacientes, bem como aplicar escala de incapacidade de Kamofsky (Schiff e Wen, 2004), além de um questionário semiestruturado para detecção de eventos epiléticos. Todas as variáveis clínicas e demográficas já coletadas prospectivamente serão associadas às obtidas das entrevistas estruturadas e transferidas ao programa SPSS 10.0 (Chicago USA). Serão estudadas as seguintes variáveis: idade, sexo, ano de atendimento, causa do TCE, escala de coma de Glasgow na admissão, classificação tomográfica de Marshall, presença ou não de hemorragia subaracnóidea, traumas associados (face, coluna cervical, coluna torácico-lombar, tórax, abdome, membros e outros), pneumotórax ou hemotórax associado presença de instabilidade hemodinâmica ou distúrbios hidroeletrólitos na internação, glicemia de admissão na UTI, exame das pupilas (isocóricas, anisocóricas, midríaticas e mióticas), mortalidade intrahospitalar e após a alta, incapacidade e qualidade de vida após a alta, presença de convulsões na internação e após a alta afastamento do trabalho após a internação. A análise estatística mortalidade intra-hospitalar será realizada inicialmente através de uma análise univariada na qual a variável dependente será a mortalidade intra-hospitalar e as variáveis independentes (categóricas, discretas e contínuas) serão as apresentadas no questionário. Também serão estudados os fatores de risco para o surgimento de epilepsia secundária ao trauma, a análise será semelhante, sendo, no entanto a variável dependente a presença ou não de epilepsia ao invés da mortalidade. Para os estudos de neuroquímica e estresse oxidativo, serão coletadas amostras de sangue nas primeiras 6 -12 horas e 5 dias (nos casos de pacientes internados) após a chegada de pacientes com TCE leve, moderado e severo, grave. Como grupo controle serão coletadas amostras de pessoas hígidas pareadas para sexo e idade.

IV- Comentários: Trata-se de um projeto bem escrito, bem delineado e plenamente justificada a relevância científica e social. Os autores tem a competência plenamente demonstrada pelos currículos e a documentação está de acordo com o que é requerido.

V- Parecer: Pelo exposto, somos de parecer que este Comitê aprove o presente projeto, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Aprovado (x)

Aprovado "ad referendum" ()

Aprovado e encaminhado ao CONEP ()

Com pendências ()

Reprovado()

VI- Data da Reunião: 30 de maio de 2005.

ANEXO B - PUBLICAÇÕES REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

1.LOPES, M. W. ; SOARES, FLÁVIA MAHATMA SCHNEIDER ; MELLO, N. ; NUNES, J. ; CAJADO, A. ; BRITO, D. ; CORDOVA, F. ; CUNHA, R. ; Walz, R. ; LEAL, R. . Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. *Experimental Brain Research*, v. 226, p. 153, 2013. doi: 10.1007/s00221-013-3421-8. Epub 2013 Feb 8.

2.HOHL, A. ; GULLO, J.S. ; MORÉ, M. ; FELISBERTO, F. ; NUNES, J. ; DE SOUZA, B. ; PETRONILHO, F. ; SCHNEIDER SOARES, FLÁVIA MAHATMA ; PREDIGER, R.D. S. ; PIZZOL, FD ; LINHARES, M. N. ; WALZ, R. . Plasma levels of oxidative stress biomarkers and hospital mortality in severe head injury: A multivariate analysis. *Journal of Critical Care*, v. 27, p. 523.e11-523.e19, 2012. doi: 10.1016/j.jcrc.2011.06.007. Epub 2011 Jul 30.

3.LOPES, MW ; SCHNEIDER SOARES, FLÁVIA MAHATMA ; de MELLO, N ; NUNES, J. ; CORDOVA, FM ; Walz, R. ; LEAL, RB . Time-Dependent Modulation of Mitogen Activated Protein Kinases and AKT in Rat Hippocampus and Cortex in the Pilocarpine Model of Epilepsy. *Neurochemical Research*, v. 37, p. 1868-1878, 2012. doi: 10.1007/s11064-012-0797-y. Epub 2012 May 22.

4.GULLO, J.S. ; MORÉ, M. ; SILVA, C.C.P. ; SCHWARZBOLD, M. ; DIAZ, A.P. ; SCHNEIDER SOARES, FLÁVIA MAHATMA ; FREITS, F.C. ; NUNES, J. ; PINHEIRO, J.T. ; MORATO, E. F. ; LINHARES, M. N. ; PREDIGER, R.D. S. ; WALZ, R. . Hospital Mortality of Patients with Severe Traumatic Brain Injury is Associated with Serum PTX3 Levels. *Neurocritical Care*, v. 14, p. 194-199, 2011. doi: 10.1007/s12028-010-9462-y.

5.SIMÃO, F. ; MATTÉ, A. ; MATTÉ, C ; SCHNEIDER SOARES, FLÁVIA MAHATMA ; WYSE, A. T. S. ; NETTO, C.A. ; SALBEGO, C.G. . Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na⁺K⁺-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 22, p. 921-928, 2011. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.07.013. Epub 2011 Jan 3.